

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Untersuchungen zum Einfluss nahezu
kohlenhydratfreier, fettreicher Diäten auf die
somatotrope Achse bei der Ratte:
Antagonisierung diätinduzierter Effekte durch Gabe
von rekombinantem Wachstumshormon**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lothar Johannes Spangler
aus München

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Josefine Römmeler-Zehrer
Priv. Doz. Dr. med. Maximilian Bielohuby

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Bidlingmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2014

Meinen Eltern

„Food is an important part of a balanced diet.”

Fran Lebowitz

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1.	Übergewicht als Krankheit.....	1
2.	Nahezu kohlenhydratfreie Diäten.....	2
3.	Die somatotrope Achse	5
4.	Leptin	7
5.	Ziel dieser Arbeit.....	7
II	Material und Methoden.....	9
1.	Tiermodell, Haltung und Tötung.....	9
2.	Lebendgewichtbestimmung.....	10
3.	Futter, Pair Feeding	10
4.	Wachstumshormon und Kontrollsubstanz	11
5.	Kalorimetrie.....	12
a)	Indirekte Kalorimetrie – Grundlagen	12
b)	Aufbau und Betrieb der metabolischen Käfige	12
6.	Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials	14
a)	Serum.....	14
b)	Bestimmung des Körperfettanteils.....	15
7.	Biochemische Methoden	15
a)	Immunoassays – Grundlagen	15
b)	Durchführung	15
c)	Leptin.....	16
d)	IGF-I	16
e)	GH.....	17
8.	Statistische Analyse.....	17
9.	Studiendesign.....	17
a)	Studie 1	18
b)	Studie 2	18
c)	Studie 3	19

III	Ergebnisse	20
A	Studie 1: Dosisabhängige Effekte von Wachstumshormon unter Chow	20
1.	Entwicklung des Körpergewichts	20
2.	Körperzusammensetzung	21
3.	Hormonwerte	22
a)	Leptin.....	22
b)	IGF-I	23
B	Studie 2: Dosisabhängige Effekte von Wachstumshormon unter LCHFD	25
1.	Entwicklung des Körpergewichts	25
2.	Körperzusammensetzung	26
3.	Hormonwerte	27
a)	Leptin.....	27
b)	IGF-I	28
C	Studie 3: Vergleich der Effekte von Wachstumshormon unter Chow und LCHFD	29
1.	Entwicklung des Körpergewichts	29
2.	Körperzusammensetzung	30
3.	Hormonwerte	31
a)	Leptin.....	31
b)	IGF-I	33
c)	GH.....	34
4.	Kalorimetrische Parameter	35
a)	Respiratorischer Quotient	35
b)	Energieumsatz.....	38
IV	Diskussion	41
1.	Ergebnisse der Pilotstudien.....	41
2.	Entwicklung des Körpergewichts	42
3.	Körperzusammensetzung	42
4.	GH und IGF-I.....	43
5.	Kalorimetrie.....	45
6.	Schlussfolgerungen.....	47
V	Zusammenfassung.....	49

VI	Literaturverzeichnis.....	51
VII	Abkürzungsverzeichnis	60
VIII	Abbildungsverzeichnis.....	61
IX	Tabellenverzeichnis.....	63
X	Anhang	64
1.	Injektionstechnik.....	64
2.	Laparatomie.....	65
3.	Bestimmung des Körperfettanteils	65
XI	Danksagung	68
XII	Lebenslauf.....	69
XIII	Eidesstattliche Versicherung	70

I Einleitung

1. Übergewicht als Krankheit

Während des größten Teils der Geschichte der Menschheit galten Körpergewichtszuwachs und Anreicherung von Fettgewebe als Zeichen von Gesundheit und Wohlstand. Auf der Grundlage unsteter Nahrungsmittelversorgung war der hauptsächliche Gesichtspunkt in Bezug auf Ernährung die Zufuhr von ausreichend Energie (World Health Organization 2000). Heutzutage jedoch sind in vielen Ländern die beherrschenden Themen der Ernährung bewusster Gewichtsverlust und Bemühungen um das Erreichen von Normalgewicht, denn Übergewicht und Fettleibigkeit bedrohen die Gesundheit von Menschen in weiten Teilen der Erde. 1997 hat die Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) die Folgen von Übergewicht und Adipositas als globales Problem anerkannt. Seit 1995 wird als probate anthropometrische Methode zur groben Erfassung des Ernährungszustandes der Body-Mass-Index (BMI) verwendet (WHO 1995; James 2008). Der BMI, der bereits im 19. Jahrhundert entwickelt wurde, ist der Quotient aus Körpermasse in Kilogramm dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern (Quetelet 1869). Als Normalgewicht wird ein BMI zwischen 18,50 und 24,99 angesehen; als übergewichtig gelten Individuen mit einem BMI größer oder gleich 25, und ab einem BMI von 30 spricht man von Adipositas (WHO 1995; National Institutes of Health 1998; WHO 2000). Diese Festlegung ist willkürlich und basiert auf der Erkenntnis, dass überschüssiges Körperfett und erhöhte BMI zu einem Anstieg der Morbidität und Mortalität führen (Berrington de Gonzalez et al. 2010). Es ist erwiesen, dass Übergewicht und Adipositas zu den Hauptursachen zahlreicher kardiovaskulärer, maligner, endokrinologischer und muskuloskelettaler Krankheitsbilder zählen (Willett et al. 1999; Haslam und James 2005; Poirier et al. 2006; Brown et al. 2009; Guh et al. 2009; Pi-Sunyer 2009).

Die Prävalenz des Übergewichts und der Adipositas hat in den letzten Jahrzehnten weltweit zugenommen; Schätzungen der WHO zufolge gab es 2005 1,6 Milliarden übergewichtige und adipöse Erwachsene (15 Jahre und älter) weltweit und 2008 waren mehr als zwei Drittel der erwachsenen US-Amerikaner und fast 60 % aller erwachsenen Deutschen übergewichtig bzw. adipös (Wang und Lobstein 2006; WHO 2006; Max-Rubner-Institut 2008; Flegal et al. 2010; Nguyen und El-Serag 2010). Würde die Zunahme der Prävalenz des Übergewichts und der Adipositas in Zukunft weiter so fortschreiten wie in den vergangenen 30 Jahren, so gäbe es im Jahr 2048 keine normalgewichtigen US-Amerikaner mehr (Wang et al. 2008).

Einher mit dieser enormen Entwicklung geht die Steigerung der durch Übergewicht und Adipositas entstehenden Kosten für das öffentliche Gesundheitswesen (Finkelstein et al. 2005). 2006 gingen beispielsweise mehr als 6% der Ausgaben im Gesundheitswesen der Europäischen Region der WHO auf Adipositas zurück. Die indirekten Kosten durch den Verlust an Leben, an Produktivität und entsprechenden Einkommen werden mindestens doppelt so hoch geschätzt (WHO/Europe 2006).

Dieser weltweiten Dimension des Übergewichts und der Adipositas (global obesity, „globesity“), die mit ihren Folgen sogar den seit zwei Jahrhunderten anhaltenden Trend zu wachsender Lebenserwartung umkehren könnte, wird durch vielgestaltige Maßnahmen begegnet, denn Übergewicht und Adipositas gelten nach wie vor als *vermeidbare* Ursachen von Krankheit – auch wenn sie, in den USA z. B., mittlerweile die zweithäufigsten vermeidbaren Ursachen von Krankheit und Tod darstellen (Deitel 2002; Olshansky et al. 2005; Brawer et al. 2009). So finden sich verschiedenste Ansätze wie Diätformen, Bewegungsprogramme, Aufklärungskampagnen, Entwicklungen der Pharmakologie und Chirurgie, sozialpsychologische und städtebauliche Projekte zur Bekämpfung von Übergewicht und Adipositas, sowie weit über 100000 wissenschaftliche Arbeiten (National Library of Medicine 2010) zu diesem Thema. All diese staatlichen, wirtschaftlichen und privaten Anstrengungen haben die Entstehung der heutigen Prävalenz nicht verhindern können. Unter den zahllosen erdachten Diätformen erfreuten sich in den westlichen Ländern in jüngerer Vergangenheit besonders diejenigen mit drastischer Reduzierung des Kohlenhydratanteils großer Beliebtheit; 2004 folgte jeder elfte US-Amerikaner einer solchen Diät (Kaufman 2005).

2. Nahezu kohlenhydratfreie Diäten

Ist der Anteil der Kohlenhydrate am Energiegehalt einer Diät bei Erwachsenen im Bereich von 20 – 60 Gramm pro Tag bzw. unter 20% der gesamten Kalorienaufnahme pro Tag, so spricht man von nahezu kohlenhydratfreien Diäten (low-carbohydrate diets); bei der Sonderform very low-carbohydrate diets ist die Kohlenhydrataufnahme meist auf unter 20 Gramm pro Tag reduziert, jedoch ist die Nomenklatur uneinheitlich. In beiden Ernährungsformen ist der Anteil der Protein- und vor allem der Fettfraktion entsprechend erhöht (Adam-Perrot et al. 2006; Last und Wilson 2006). Very low-carbohydrate diets werden seit den 1970er Jahren meist in Form der nach Robert Atkins benannten Atkins Diät, die sich durch einen stark erniedrigten Anteil an Kohlenhydraten bei sehr hohem Fettanteil (nahezu kohlenhydratfreie fettreiche Diät, low-carbohydrate high-fat diet,

LCHF) zeichnet, vor allem im anglo-amerikanischen Raum zur Gewichtsreduktion propagiert (Atkins 1972). In der sog. Induktionsphase der Atkins Diät ist diese eine ketogene Diät, d. h. der Kohlenhydratanteil der Nahrung ist derart eingeschränkt, dass zur Deckung des Energiebedarfs in der Leber Fettsäuren zu Ketonkörpern abgebaut werden. Zu den Ketonkörpern zählen Acetoacetat, Aceton und β -Hydroxybutyrat; sie können die Blut-Hirn-Schranke passieren und so an Stelle von Glukose als Energielieferant der Neuronen dienen. In einer aktuellen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass zur Induktion einer ketotischen Stoffwechsellaage bei Ratten nicht nur ein geringer Kohlenhydratanteil, sondern auch ein hoher Fett- bei einem geringen Proteinanteil notwendig sind (Bielohuby et al. 2011). Jenseits der bewusst herbeigeführten Ketose im Rahmen einer LCHF tritt diese Stoffwechsellaage als Hungerzustand nach Phasen längerer Nahrungs- bzw. Kohlenhydratkarenz (Kohlenhydratzufuhr unter 20 g/d) ein (Persson 2008; Wylie-Rosett und Davis 2009).

Außer als Diäten zur Gewichtsreduktion finden LCHF Anwendung zur Behandlung von bestimmten Formen kindlicher Epilepsien, wo durch die Ketose eine Reduktion der Anfallshäufigkeit erreicht werden kann (Huffman und Kossoff 2006). Darüber hinaus scheinen LCHF positive Effekte in der Behandlung anderer neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson zu haben (Baranano und Hartman 2008).

Die Wirksamkeit von LCHF hinsichtlich einer Reduktion des Körpergewichts, vor allem bei adipösen Patienten, wurde in zahlreichen Studien gezeigt (Foster et al. 2003; Gardner et al. 2007; Shai et al. 2008; Westman et al. 2008). Die häufigen subjektiv empfundenen unerwünschten Wirkungen, wie z. B. Obstipation durch den geringen Anteil von Ballaststoffen an der Nahrung oder Ermüdungserscheinungen durch die ketotische Stoffwechsellaage, haben der Begeisterung für diese Diät keinen Abbruch getan (Ghoshal 2007; White et al. 2007; Scott 2009). Doch das Verständnis dieser Diät und ihrer Mechanismen und somit auch die wissenschaftliche Grundlage ihrer Befürwortung sind keinesfalls gegeben. Naheliegenderweise wurden aufgrund der stark zu Gunsten des Fettanteils veränderten Zusammensetzung dieser Ernährungsform zahlreiche Bedenken geäußert (Joost 2003; Astrup et al. 2004; Bantle et al. 2008; Wylie-Rosett und Davis 2009; Wolfram 2010).

In einer Reihe von Studien an zumeist übergewichtigen Erwachsenen konnte jedoch gezeigt werden, dass zu den kurzfristigen Auswirkungen von LCHF trotz erhöhtem Fettverzehr paradoxerweise erniedrigte Serumwerte von Triglyzeriden, Gesamtcholesterin

und low-density-lipoprotein sowie ein Anstieg von high-density-lipoprotein zählen. Ebenso wurde von reduzierten Nüchternwerten für Insulin und Glukose sowie von einer Senkung des Blutdrucks und verschiedener mit Atherosklerose assoziierter Inflamationsparameter berichtet (Westman et al. 2002; Brehm et al. 2003; Samaha et al. 2003; Sondike et al. 2003; Meckling et al. 2004; Sharman et al. 2004; Sharman und Volek 2004). Mit wenigen Ausnahmen gibt es aber keine Daten, die eine günstige Entwicklung von kardiovaskulären Risikofaktoren (z. B. Reduktion des Körpergewichts, Verbesserung des Lipidprofils) unter einer LCHFD nach einer Anwendung von mehr als 12 Monaten zeigen (Shai et al. 2008; Sacks et al. 2009). Überdies muss angenommen werden, dass der erhöhte Fettanteil von LCHFD mit einer erhöhten Aufnahme von gesättigten und *trans*-Fettsäuren einhergeht, was die Entstehung kardiovaskulärer Risikofaktoren begünstigt (Boden et al. 1994; Damjanovic und Barton 2008). Bei der o. g. Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren unter LCHFD ist ferner zu bedenken, dass bei Nagern gezeigt werden konnte, dass die Entstehung von Atherosklerose unter einer LCHFD unabhängig von gängigen Biomarkern für diese Entwicklung ist (Foo et al. 2009). Neben einem unklaren Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko können mit LCHFD weitere unerwünschte Wirkungen einhergehen. So ist z. B. durch den bei solchen Diäten meist erhöhten Fleischkonsum eine Steigerung des Risikos der Entstehung kolorektaler Karzinome wahrscheinlich (Chao et al. 2005).

Ferner ist aufgrund der eingeschränkten Nahrungsauswahl und der Reduktion des Verzehrs von Obst die Gefahr einer Unterversorgung mit Ballaststoffen, Vitaminen und Mineralstoffen gegeben.

Zusätzlich kann unter LCHFD die renale Kalziumausscheidung erhöht sein und es konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass LCHFD zu Osteopenie, Osteoporose und zu einer Einschränkung des Knochenwachstums führen (Hahn et al. 1979; Westman et al. 2002; Bergqvist et al. 2008). In Tiermodellen ging der unter einer LCHFD gestörte Knochenstoffwechsel (Retardierung des longitudinalen Wachstums und der Mineralisation des Knochens) zudem mit einer Reduktion der Serumkonzentration des insulin-like growth factor I (IGF-I) einher (Bielohuby et al. 2009).

Es ist bekannt, dass Diätformen mit hohem Fettanteil die zirkulierende Somatostatinkonzentration erhöhen und die Wachstumshormonkonzentration erniedrigen können (Penman et al. 1981; Cappon et al. 1993). Passend hierzu konnten wir, in veröffentlichten und unveröffentlichten Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe, an

Ratten zeigen, dass unter Fütterung einer LCHFD die Serumkonzentrationen von IGF-I- und Wachstumshormon (growth hormone, GH) reduziert sind (Caton et al. 2009).

3. Die somatotrope Achse

Wachstumshormon, auch Somatotropin oder somatotropes Hormon genannt, ist ein Peptidhormon und wird in der Adenohypophyse gebildet. Die Regulation der Bildung und Freisetzung von GH (siehe Abb. 1-1) geschieht primär über zwei Peptidhormone aus dem Hypothalamus: durch den Einfluss von Somatoliberin (growth hormone releasing hormone, GHRH) wird die Freisetzung von GH stimuliert und Somatostatin (growth hormone inhibiting hormone, GHIH) hemmt diesen Vorgang (Schweikert 2001). Darüber hinaus wird die GH-Sekretion von Ghrelin, einem Peptidhormon, das hauptsächlich in der Magenschleimhaut und im Pankreas produziert wird, als peripherem Regulator stimuliert (Kojima et al. 1999). Die spontane Sekretion von GH aus der Adenohypophyse in den Blutkreislauf ist pulsatil und unterliegt einer zirkadianen Rhythmik (Wajnrajch 2005; Goldenberg und Barkan 2007).

Für Wachstumshormon besteht eine Speziespezifität, wobei das GH höher entwickelter Arten, z. B. humanes Wachstumshormon, auch bei nieder entwickelten Arten biologisch wirksam ist, jedoch nicht umgekehrt (Knobil und Greep 1959). Die zelluläre Signaltransduktion erfolgt in mehreren Schritten, die mit der spezifischen Bindung an einen Membranrezeptor beginnen (Kelly et al. 2001). Dieser Wachstumshormonrezeptor besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranen sowie einer intrazellulären Domäne. Letzere ist mit einer intrazellulären Signalkaskade, bestehend aus einem Netzwerk von Kinasen, gekoppelt und vermittelt so die biologische Antwort. In Abhängigkeit der Konzentrationen des zirkulierenden GH werden in peripheren Zellen – hauptsächlich in Hepatozyten – Wachstumsfaktoren (Somatomedine) gebildet.

Die sog. Somatomedinhypothese besagte, dass die Wirkung von GH ausschließlich durch endokrin aktives IGF-I vermittelt wird, dessen Synthese in der Leber durch GH stimuliert wird (Salmon und Daughaday 1957; Daughaday et al. 1972). Diese Theorie hat aufgrund zahlreicher widersprüchlicher Beobachtungen Modifikationen erhalten. Heute weiß man, dass einerseits ein Teil der GH-Wirkung über Somatomedine – hauptsächlich über Somatomedin C (veraltet, heute: IGF-I) – vermittelt wird, wobei die Bildung von IGF-I zum Teil auch extrahepatisch (Knochen, Muskulatur etc.) erfolgt. Andererseits besitzt GH auch eine direkte Wirkung auf verschiedene Zellen und Gewebe (Berneis und Keller 1996;

Mauras und Haymond 2005). Im Sinne eines negativen Feedbacks wird die hypophysäre Sekretion von GH durch IGF-I gehemmt.

Die Stimulation der Zelldifferenzierung, die proliferativen Effekte und die Stimulation des Längenwachstums sind hauptsächlich von IGF-I vermittelt, während GH selbst vielfältige, komplexe Wirkungen auf den Stoffwechsel induziert (Le Roith et al. 2001; Vijayakumar et al. 2010). Im Kohlenhydratmetabolismus entfaltet exogen verabreichtes GH anfangs eine insulinähnliche Wirkung, wobei der blutzuckersenkende Effekt unabhängig von Insulin ist. Längerfristige Gaben von GH setzen die Sensibilität peripherer Gewebe für Insulin herab (Insulinresistenz) und können so eine Hyperinsulinämie induzieren (Fineberg und Merimee 1974; Kostyo und Reagan 1976). Im Fettstoffwechsel stimuliert GH hauptsächlich die Lipolyse und bewirkt so einen Anstieg der freien Fettsäuren und der Triglyzeride (Carrel und Allen 2000). Umgekehrt hemmen freie Fettsäuren und Triglyzeride die Sekretion von GH. Im Rahmen des Proteinmetabolismus wirkt GH vor allem anabol; es steigert die Proteinsynthese und den Aminosäuretransport in die Zellen und wirkt zugleich dem antiproteolytischen Effekt von Insulin entgegen (Fryburg et al. 1992).

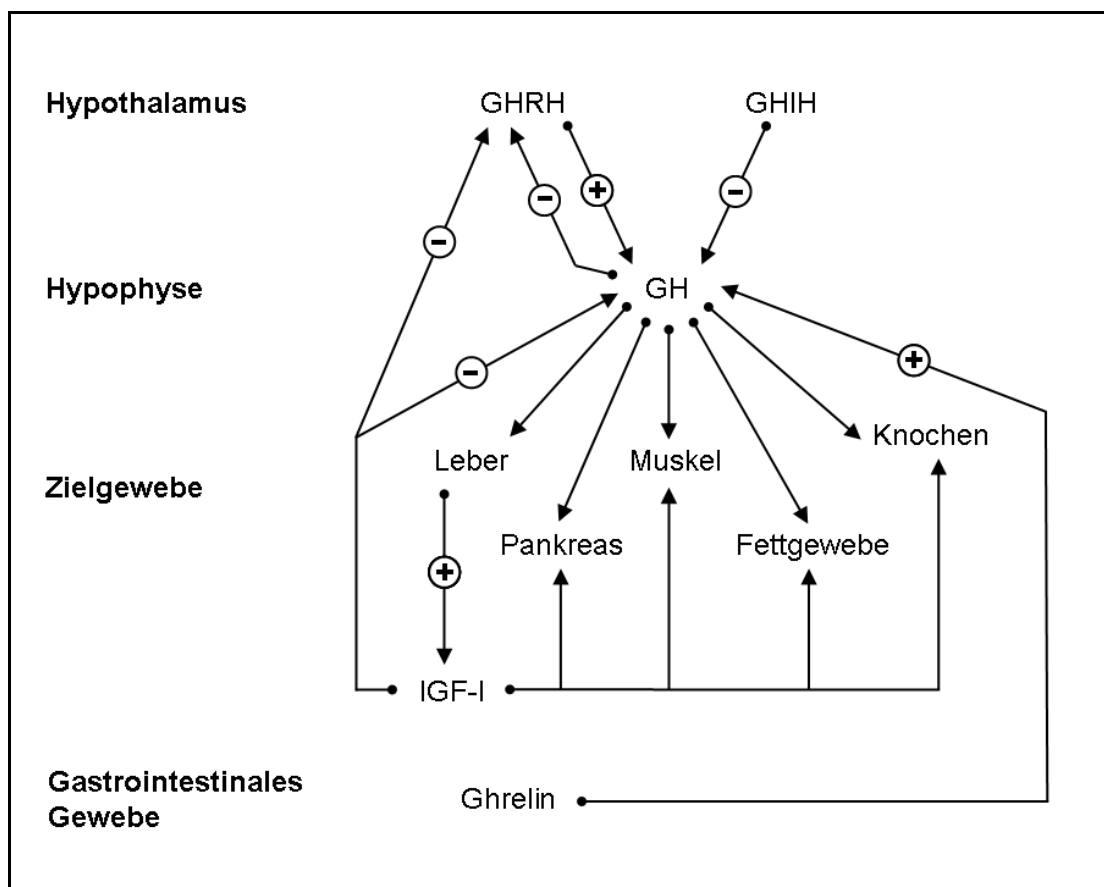


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des GH-IGF-Regelkreises (vereinfacht)
(⊕: Stimulation, ⊖: Inhibition)

4. Leptin

Leptin ist ein Proteohormon, welches hauptsächlich in Adipozyten produziert wird (Zhang et al. 1994). In geringen Mengen konnte eine Produktion in braunem Fettgewebe, der Plazenta, den Ovarien, dem Skelettmuskel, der Magenschleimhaut, dem Brustepithel, dem Knochenmark, der Hypophyse und der Leber nachgewiesen werden (Margetic et al. 2002). Die Sekretion von Leptin ist pulsatil und folgt einer zirkadianen Rhythmik (Sinha et al. 1996; Licinio et al. 1997). Der Wirkzusammenhang des 1994 entdeckten Leptins mit seinen komplexen neuroendokrinen Mechanismen ist noch nicht gänzlich verstanden. Im zentralen Nervensystem entfaltet Leptin seine Wirkung durch Bindung an Rezeptoren im Hypothalamus und anderen Regionen (Scott et al. 2009). Die Konzentration des zirkulierenden Leptin korreliert mit dem BMI (Considine et al. 1996; Ostlund et al. 1996; Friedman und Halaas 1998). Ferner wirkt Leptin auf das Immunsystem, die Angiogenese und ist an der Regulation des Knochenwachstums beteiligt (Sierra-Honigmann et al. 1998; Takeda et al. 2002; Papathanassoglou et al. 2006). Es hat eine Schlüsselfunktion im Energiehaushalt und in der Regulation der Nahrungszufuhr inne, wobei es appetithemmend wirkt (Williams et al. 2009). Bei Adipositas kann es im Rahmen einer Hyperleptinämie zu einer partiellen, erworbenen Leptin-Resistenz bzw. -Toleranz kommen, bei der die biologischen Effekte von Leptin weitgehend ausbleiben (Mark et al. 2002; Myers et al. 2008; Mantzoros et al. 2011).

5. Ziel dieser Arbeit

Die weltweit zunehmende Prävalenz von Übergewicht und Adipositas hat zur massenhaften Anwendung verschiedenster Maßnahmen zur Bekämpfung dieses Krankheitsbilds geführt. Jedoch haben viele der ergriffenen Maßnahmen, so auch eine der weltweit populärsten Diätformen, die LCHFD, ihre Popularität nicht durch gesichertes Wissen über ihre Wirkungsweise erlangt.

Ausgehend von Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass unter LCHFD eine Suppression der somatotropen Achse erfolgt, sollte im Rahmen dieser Arbeit nun die Umkehrbarkeit dieses Zusammenhangs im Rahmen von drei Studien an einem Rattenmodell untersucht werden.

Hierbei sollten insbesondere folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Effekt auf die Körpergewichtsentwicklung, die Körperzusammensetzung, sowie die Serumkonzentrationen von Leptin und IGF-I hat die Gabe verschiedener

Dosen Wachstumshormon im Vergleich zur Gabe der Kontrollsubstanz bei Ratten, die mit normaler Nagerkost ernährt werden?

- Wie wirkt sich die Gabe von Wachstumshormon bei Ratten, die eine LCHFD erhalten, auf die Körpergewichtsentwicklung, die Körperzusammensetzung sowie die Serumkonzentrationen von Leptin und IGF-I aus?
- Lassen sich die unter Fütterung einer LCHFD beobachteten Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung, die Körperzusammensetzung, den Energieumsatz, sowie die Serumkonzentrationen von Leptin, IGF-I und Wachstumshormon durch die Gabe von Wachstumshormon antagonisieren?

II Material und Methoden

1. Tiermodell, Haltung und Tötung

Für alle drei Versuche wurden männliche Ratten des Stammes Wistar (Crl:WI outbred, Charles River Laboratories Germany GmbH, Sulzfeld) verwendet. Alle Tiere wurden auf Standard-Kleintierstreu in Einzelboxen aus Makrolon (Eurostandard Typ III, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg), mit Käfigdeckeln aus Metall, in einem separaten Raum des Tierstalls der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV gehalten. Vor Beginn der Messungen wurde eine 14-tägige Adaptationsphase eingehalten. Die Tiere wurden in dieser Zeit an alle Personen und Materialien, mit denen sie während des eigentlichen Versuches regelmäßig Kontakt hatten, gewöhnt. So wurden den Tieren während dieser Phase auch regelmäßig Injektionen der Kontrollsubstanz verabreicht. Vor Studie 3 verbrachten alle Tiere zur Gewöhnung abwechselnd Zeit in dem Käfig mit dem speziellen Kunststoffdeckel, welcher für die kalorimetrischen Messungen dieser Studie zur Kontrolle des Luftflusses notwendig war. Während der Phase der Eingewöhnung und während der Versuche herrschten stets standardisierte Bedingungen (siehe Tabelle 2-1). Während der Dunkelphase wurde im Tierstall bei Fütterung, Reinigung und Injektionsbehandlung nur Rotlicht verwendet, da dieses von Ratten kaum wahrgenommen werden kann (Weiss et al. 1996).

Licht-Dunkel-Regime	12 h / 12 h künstliches Licht von 23 bis 11 Uhr
Lufttemperatur*	20,5 ± 0,8 °C
Luftfeuchtigkeit*	62 ± 4,2 %
Zugang zu Frischwasser	Ad libitum per Nippeltränke

Tab. 2-1: Haltungsbedingungen der Tiere.

* Mittelwerte ± Standardabweichung; während allen Studien täglich erfasst

Den mit dem Standard-Trockenfuttermittel gefütterten Tieren wurde das Futter in einem Futterkorb im Deckel der Box angeboten; bei den Tieren, die die LCHFD bekamen, wurde das Futter, das aufgrund des hohen Fettanteils eine pastöse Konsistenz hat, in Porzellanschalen im Käfig platziert. Alle Tiere hatten, unabhängig vom verwendeten

Futter, identische Bedingungen im Käfig (Nippeltränke, Porzellanschale, Futterkorb). Die Einstreu sowie Frischwasser wurden ein Mal pro Woche gewechselt.

Am Ende jeder Studie wurden alle Tiere getötet. Zuvor wurde jedes Tier für sechs Stunden genüchtert, und jeweils unmittelbar vor der Tötung aus dem Tierstall in einen benachbarten Raum zur Narkotisierung und anschließend in einen weiteren Raum zur Dekapitation gebracht. Die Narkose erfolgte durch Inhalation von Isofluran (Forene[®], Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in einem separaten Behälter; sobald die Tiere das Bewusstsein verloren hatten, wurden sie mit einer Guillotine (Eigenfabrikat) dekapitiert.

Alle Tierversuche fanden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern statt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531.6-47-05). Die Entsorgung der getöteten Tiere erfolgte nach Gewinnung des Probenmaterials gemäß den Bestimmungen des Tierkörperbeseitigungsgesetzes (BGBI 2001).

2. Lebendgewichtbestimmung

Alle Tiere wurden ab ihrer Lieferung täglich in der ersten Stunde der Dunkelphase gewogen. Um eine möglichst genaue Bestimmung des Gewichts zu gewährleisten, wurde eine Waage (Sartorius CP 2201, Sartorius AG, Göttingen) mit dynamischer Wägefunktion (20 aufeinander folgende Messungen innerhalb von zwei Sekunden und Errechnung des Mittelwerts) benutzt, wodurch Verfälschungen durch Bewegungen der Versuchstiere minimiert wurden. Die Gewichtsangaben in Gramm wurden auf eine Nachkommastelle genau erfasst.

3. Futter, Pair Feeding

Während der Eingewöhnungsphase wurden alle Tiere mit einem pelletierten Standardtrockenfuttermittel (Standard Lab Chow, im Folgenden „Chow“ genannt, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Im Verlauf der Studien erhielten alle Tiere je nach Gruppenzugehörigkeit entweder weiterhin Chow oder eine pastöse LCHFD (im Folgenden „LCHFD“ genannt, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Die Zusammensetzungen der beiden Diäten sind in Tabelle 2-2 dargestellt. Beiden Kostformen waren Vitamine und Mineralstoffe gemäß den Vorgaben des National Research Council zugesetzt (NRC 1995). Per Nippeltränke hatten alle Tiere ad libitum Zugriff auf Frischwasser.

Frühere Studien mit dieser LCHFD haben gezeigt, dass diese Kostform im Vergleich mit Chow von Ratten bevorzugt wird und mit LCHFD gefütterte Tiere bei ad libitum angebotener Nahrung höhere Mengen (etwa 20% mehr) an Kalorien konsumieren. Deshalb

wurde in den Studien mit LCHFD durch *pair feeding* gewährleistet, dass die aufgenommene Nahrung aller Gruppen den gleichen Brennwert enthält. Täglich wurde zu Beginn der Dunkelphase zunächst bei den Tieren der Chow-Gruppen die durchschnittliche Futteraufnahme durch Wiegen des vom Vortag verbliebenen Futters bestimmt. Anschließend wurde die darin enthaltene Energie errechnet und ermittelt, welcher Menge LCHFD dieser Brennwert entspricht und die entsprechende isokalorische Menge dieser Diät den Tieren der LCHFD-Gruppen zu Beginn der Dunkelphase verabreicht. Am Folgetag wurde jeweils kontrolliert, ob die Tiere der LCHFD-Gruppen die ihnen angebotene Nahrung vollständig verzehrt haben, was an allen Tagen der betroffenen Studien der Fall war.

	Chow	LCHFD
Kohlenhydrate	58 %	1,3 %
Fett	9 %	94 %
Protein	33 %	4,2 %
Energiedichte	3,04 kcal/g	7,5 kcal/g

Tab. 2-2: Zusammensetzung der verwendeten Diäten; Prozentangaben stellen den Anteil am Energiegehalt der Kostformen dar

4. Wachstumshormon und Kontrollsubstanz

Bei dem im Rahmen der vorgestellten Studien verwendeten Wachstumshormonpräparat handelt es sich um ein rekombinantes humanes Wachstumshormon, das in *Escherichia coli* exprimiert wurde (Norditropin, Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz). Als Kontrollsubstanz wurde dasselbe Volumen destilliertes Wasser (Aqua ad iniectabilia [Aqua ad ini.]) verabreicht (Ecoflac plus, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Beide Substanzen wurden subkutan mit sterilen Einwegspritzen (BD Micro-Fine+ 30G, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) appliziert. Hierzu wurde der Kopf der Tiere der Hand fixiert und die Injektion im Bereich des Rückens vorgenommen (s. Abb. A-1 im Anhang). Um lokale Akkumulationen der verabreichten Substanzen sowie Reaktionen des Gewebes, die die Resorption beeinflussen könnten (Fibrosierungen), zu vermeiden, wurden die Injektionen an wechselnden Stellen vorgenommen. Hierzu wurde folgendes Schema entwickelt: Auf der in Bauchlage fixierten und von dorsal betrachteten Ratte wurden vier Punkte am Rücken, entsprechend den Uhrzeiten 3, 6, 9 und 12 Uhr eines Zifferblatts,

festgelegt (s. Abb. A-2 im Anhang). Nun wurde, beginnend bei „12 Uhr“, die Einstichstelle bei jeder Injektion im Uhrzeigersinn gewechselt.

5. Kalorimetrie

In Studie 3 wurden in einem Kalorimetriesystem (CaloSys Calorimetry Module, TSE Systems GmbH, Bad Homburg) die Parameter Energieumsatz und respiratorischer Quotient mittels indirekter Kalorimetrie im offenen System bestimmt.

a) Indirekte Kalorimetrie – Grundlagen

Bei der indirekten Kalorimetrie erfolgt die Bestimmung der von einem Organismus produzierten Energie nicht in Form von Messung der produzierten Wärme (direkte Kalorimetrie), sondern durch die Ermittlung des verbrauchten Sauerstoffs (O_2) und der Produktion von Kohlenstoffdioxid (CO_2). Die Menge des produzierten Sauerstoffs ist ein Maß für die Energie- bzw. Wärmeproduktion, weil Energie auf zellulärer Ebene unter Normalbedingungen hauptsächlich durch den oxidativen Abbau der Nährstoffe aus der Nahrung bzw. der körpereigenen Energiespeicher gewonnen wird und die Speicherkapazität des Körpers für Sauerstoff sehr gering ist (Schutz 1997; Noack 1999; Grote 2000).

Das Verhältnis von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidabgabe wird als respiratorischer Quotient (RQ) bezeichnet. Da der oxidative Abbau der Makronährstoffe nach einer im Prinzip verstandenen Stöchiometrie erfolgt, lässt sich jedem Nährstoff ein bestimmtes Verhältnis an Kohlendioxidproduktion und Sauerstoffverbrauch zuordnen (Jeukendrup und Wallis 2005). Somit kann aus dem respiratorischen Quotienten in Kenntnis der physiologischen Brennwerte der utilisierten Nährstoffe der Energieumsatz berechnet werden. Zur exakten Berechnung benötigt man als Maß des Proteinkatabolismus zusätzlich die Stickstoffausscheidung im Urin, jedoch kann man den Energieumsatz auch ohne diese Größe mittels verschiedener Formeln berechnen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Messsystem berechnet den Energieumsatz automatisch aus den Messwerten der Atemgasanalyse basierend auf der Gleichung von Weir (Weir 1949).

b) Aufbau und Betrieb der metabolischen Käfige

Das verwendete Kalorimetriesystem ist eine kommerziell erhältliche Anlage zur indirekten Kalorimetrie bei Labornagern. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

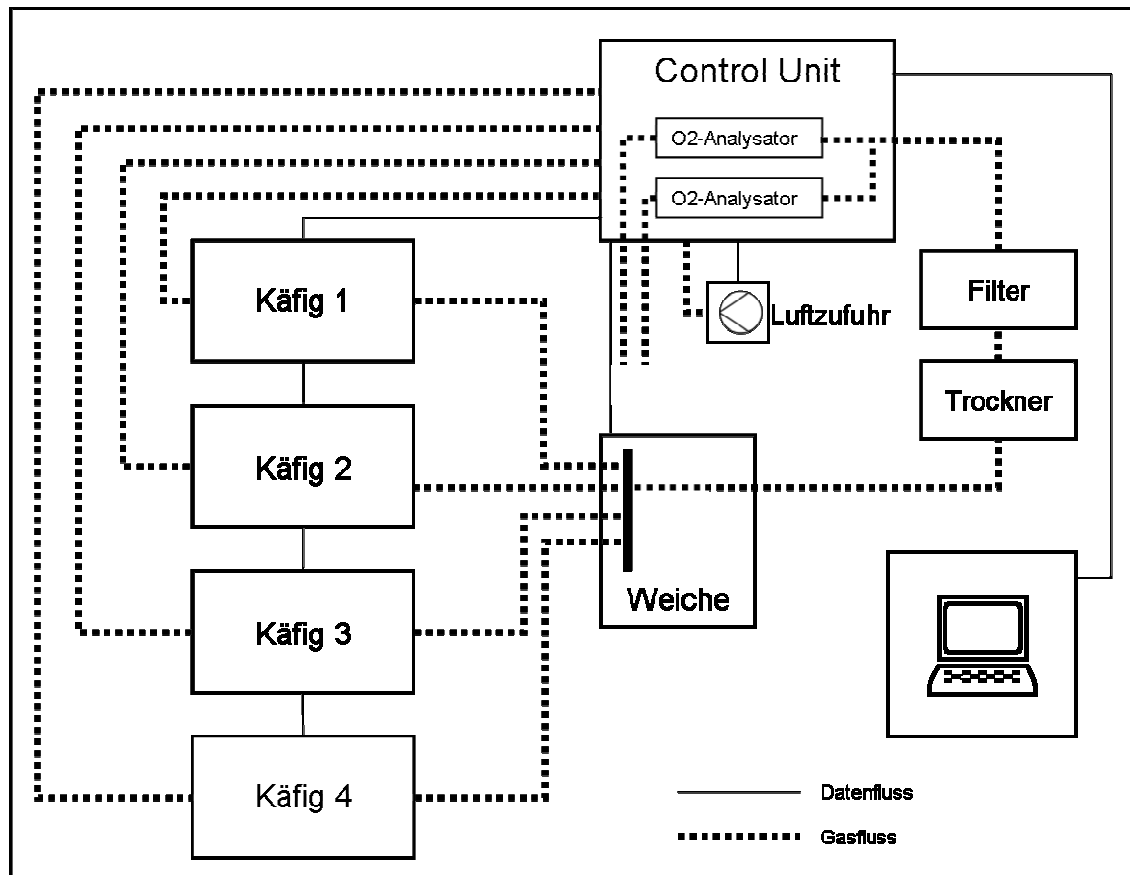


Abb. 2-1: Schematischer Aufbau des Kalorimetriesystems. Käfig 2 ist exemplarisch zur Gasanalyse angeschlossen.

Das System besteht aus einer *Control Unit*, die Sensoren zur Ermittlung der Konzentrationen von O₂ und CO₂ enthält. Über eine von der *Control Unit* angesteuerte Pumpe wird Raumluft mit einer konstanten Durchflussrate von ca. 2 l/min durch die vier Messkäfige gepumpt (offenes System). Die Schlauchverbindungen zwischen den Käfigen und der *Control Unit* sind mit einer Weiche so angeordnet, dass abwechselnd Proben aus den vier Messkäfigen genommen werden können. Die *Control Unit*, die außerdem die Temperatur misst, steht in Verbindung mit einem Computer, mit dessen Software (LabMaster CaloSys, TSE Systems GmbH, Bad Homburg) die Anlage gesteuert wird sowie alle Messwerte aufgezeichnet und abgeleitete Größen (Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Energieumsatz, s. o.) berechnet werden.

Die Tiere blieben für die Messungen in ihrer Box, allerdings wurde der Käfigdeckel durch einen luftdicht schließenden Kunststoffdeckel ersetzt; die Wasserflasche mit Nippeltränke sowie ein Futterkorb für Chow waren an diesem Deckel befestigt. Alle Messkäfige wurden kontinuierlich mit Raumluft durchströmt. Nacheinander wurden für jeweils drei Minuten die Konzentrationen von O₂ und CO₂ in einem der vier Käfige gemessen. Außerdem wurde für ebenfalls drei Minuten die entsprechende Zusammensetzung der Raumluft analysiert,

so dass ein Messzyklus 15 Minuten in Anspruch nahm. Um die Messgenauigkeit zu erhöhen wurde zur Vermeidung von Kondenswasser der Luft des jeweils mit der Sensoranlage verbundenen Käfigs Luftfeuchtigkeit entzogen und der Luftstrom zusätzlich gefiltert. In der in die *Control Unit* geleitete Luft wurde mit einem Infrarot-Gassensor die Konzentration von CO₂ und mit einem Sensor aus zwei Zirkonium-stabilisierten Elektroden die Konzentration von O₂ bestimmt. Die Sensoren wurden in regelmäßigen Abständen durch Kalibrierung gegen ein standardisiertes Testgas geeicht.

Alle Datensätze, in denen der RQ Werte von unter 0,5 und über 1,5 betrug, wurden nicht in die Analyse miteinbezogen (offensichtliche Fehlmessungen). Aufgrund der zirkadianen Rhythmik des Aktivitätsniveaus der Ratten werden die Ergebnisse der Messungen des respiratorischen Quotienten und des Energieumsatzes getrennt nach Lichtphase (Ruhephase) und Dunkelphase (Aktivphase) ausgewertet.

6. Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

Unmittelbar nach der Dekapitation erfolgte die Gewinnung der Probenmaterialien Blut und Fettgewebe.

a) Serum

Zur Gewinnung von Serum wurde sofort nach der Tötung das jeweils dekapitierte Tier für einige Sekunden über ein Trichtersystem platziert und das aus den Karotiden und Halsvenen austretende Blut in ein Röhrchen mit einem Gerinnungsaktivator (S-Monovette Serum Gel, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde das verschlossene Röhrchen mehrmals vorsichtig geschwenkt um das gewonnene Vollblut mit dem Gerinnungsaktivator zu vermischen. Anschließend wurde bis zur vollständigen Gerinnung der Probe das Röhrchen 15 Minuten aufrecht bei Raumtemperatur gelagert und für 10 Minuten mit 3000 Umdrehungen pro Minute bei 15°C zentrifugiert (Jouan GR422, Thermo Electron Deutschland GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Der Überstand (Serum) des zentrifugierten Materials wurde abpipettiert und in speziellen Röhrchen (CryoTube, Nunc GmbH & Co KG, Langenselbold) bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren (Heraeus Herafreeze BasicFreezer, Thermo Electron Deutschland GmbH & Co. KG, Karlsruhe). Aufgrund Materialmangels konnten in Einzelfällen Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

b) Bestimmung des Körperfettanteils

Die entbluteten Tiere wurden auf den Rücken gelegt und das Abdomen mit einer Stichinzision und einem Schnitt in der Medianen eröffnet (s. Abb. A-3 im Anhang). Das Skrotum wurde von inguinal eröffnet, sein Inhalt mobilisiert und das rechte epididymale Fettgewebe von Samenstrang, Nebenhoden und Hoden abpräpariert und dessen Gewicht bestimmt (s. Abb. A-4 im Anhang). Nach einer Mobilisation des Magen-Darm-Pakets wurde über einen Zugang kaudal der Leber das Retroperitoneum eröffnet und das die rechte Niere umgebende perirenale Fettkompartiment von der Niere gelöst und ebenfalls gewogen (s. Abb. A-5 und A-6 im Anhang). Außerdem wurde das rechte inguinale subkutane Fett mittels eines Skalpells mit breiter Klinge von der Innenseite der Bauchwand bis auf die Dermis abpräpariert (s. Abb. A-7 im Anhang). Als kraniale Begrenzung dieses Fettkompartiments wurde die Höhe des Xiphoids definiert; das so gewonnene Fettgewebe wurde ebenfalls sofort gewogen.

7. Biochemische Methoden**a) Immunoassays – Grundlagen**

Immunoassays sind immunologische Nachweisverfahren, die die Fähigkeit der spezifischen Bindung von Antikörpern und Antigenen nutzen, um letztere in biologischen Proben zu quantifizieren. Man unterscheidet grundsätzlich kompetitive Immunoassays, welche eher für die Messung relativ kleiner Moleküle geeignet sind, und die in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-Immunoassays, die heutzutage in aller Regel zur Bestimmung von großen Eiweißmolekülen eingesetzt werden. In beiden Assaysystemen erfolgt die Quantifizierung des Antigens in der Probe durch Vergleich des Signals mit dem Signal einer Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen. Zur Signalgebung werden verschiedene Detektionstechniken eingesetzt: Radioaktivität (Radioimmunoassays, immunradiometrische Assays), Fluoreszenz (immunfluorometrische Assays, Fluoreszenzimmunoassays), Chemilumineszenz (Lumineszenzimmunoassays, immunoluminometrische Assays) sowie Kolorimetrie (enzymgekoppelte Immunadsorptionstests, enzyme linked immunosorbent assays (ELISA))(Goldsby et al. 2003).

b) Durchführung

Alle Hormonwerte wurden mit kommerziell erhältlichen Assay Kits und gemäß den Regeln der guten Laborpraxis bestimmt (OECD 1999). Die tiefgefrorenen Proben wurden vor Beginn des jeweiligen Assays bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut. Neben der

Messung der aus den Studien gewonnenen Proben wurden in den Assay Kits enthaltene Standardkonzentrationen zur Erstellung einer Standardkurve sowie Kontrollproben gemessen. Alle Messungen wurden immer in zweifacher Ausführung vorgenommen. Die Messung der Absorption bei den jeweiligen Wellenlängen und die Umrechnung dieser Werte in Konzentrationen gemäß der Standardkurve wurden mit einem Photometer durchgeführt (Tecan Spectra II, Tecan trading AG, Männedorf, Schweiz).

c) Leptin

In den Studien 1 und 2 wurde Leptin mit einem ELISA gemessen (DSL ACTIVE Murine ELISA Kit, Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, USA). Bei diesem Assay werden die Serumproben simultan mit einem auf einer Mikrotiterplatte fixierten und mit einem mit Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) markierten Anti-Leptin-Antikörper inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit dem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) wird die enzymatische Farbreaktion mit einer sauren Stopplösung angehalten und das Absorptionsvermögen der gefärbten Lösung bei 450 und 620 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt. Die Hormonkonzentration ist proportional der Intensität der Farbreaktion. Dieser Assay besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von 5,4 – 6,9 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von 3,8 – 4,7 % (Angaben des Herstellers). Für Studie 3 wurde zur Bestimmung der Serumleptinkonzentrationen ein anderer ELISA (m/rLeptin-ELISA Kit, Mediagnost, Reutlingen) verwendet. Die Serumproben wurden hier mit einem auf einer Mikrotiterplatte fixierten und mit einem biotinylierten Anti-Leptin-Antikörper inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit einem Enzymkonjugat (Peroxidase-markiertes Streptavidin) sowie einer Substratlösung (TMB) und Zugabe einer Stopplösung wurde die Farbreaktion durch Messung der Absorption bei 450 und 620 nm Wellenlänge photometrisch quantifiziert. Der Test besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von unter 4,4 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von unter 4,7 % (Angaben des Herstellers).

d) IGF-I

In allen Studien wurde die Konzentration von IGF-I im Serum mittels eines ELISA (OCTEIA Rat/Mouse IGF-I IEMA, IDS Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, UK) gemessen. Das IGF-I aus den Proben bindet an einem auf einer Mikrotiterplatte fixierten Anti-IGF-I-Antikörper und wird mit einem zweiten, biotinylierten Anti-IGF-I-Antikörper inkubiert. Anschließend wird an Avidin gebundene HRP zugegeben und die Farbreaktion

mit TMB in Gang gesetzt; mit 0,5-molarer Salzsäure als Stopplösung wird die Reaktion gestoppt und die Farbintensität bei 450 und 650 nm Wellenlänge gemessen. Der Test besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von 4,3 – 7,3 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von 6,3 – 8,8 % (Angaben des Herstellers).

e) GH

Die Serumkonzentration von GH wurde in Studie 3 mit einem ELISA (ACTIVE Mouse/Rat Growth Hormone ELISA, Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, USA) gemessen. Die Serumproben wurden mit einem auf einer Mikrotiterplatte fixierten und mit einem mit HRP markierten Anti-GH-Antikörper inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation mit dem Substrat (TMB) wird die enzymatische Farbreaktion mit einer sauren Stopplösung angehalten und die Absorption der gefärbten Lösung bei 450 und 620 nm Wellenlänge photometrisch bestimmt. Der Test besitzt eine Intra-Assay-Genauigkeit von 2,23 – 8,61 % und eine Inter-Assay-Genauigkeit von 3,43 – 8,95 % (Angaben des Herstellers).

8. Statistische Analyse

Alle statistischen Berechnungen der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden mit spezieller Software (SPSS 16.0 und PASW Statistics 17.0, SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt. Zunächst wurden hiermit immer die Gruppen einer Studie mit dem Kruskal-Wallis-H-Test auf das Vorliegen von signifikanten Unterschieden bezüglich der geprüften Testvariable untersucht. Konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, wurden jeweils zwei Gruppen der Studie mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft.

Die Angabe des Signifikanzwerts p bezieht sich immer auf die asymptotische Signifikanz (zweiseitig) des jeweils durchgeführten Signifikanztests. Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$; „signifikant“) bzw. von weniger als 1 % ($p < 0,01$; „hochsignifikant“) festgelegt.

9. Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Pilotstudien (Studie 1 und 2) und ein Hauptexperiment (Studie 3) durchgeführt. Die Einteilung der Tiere einer Studie in die jeweiligen Gruppen erfolgte vor Studienbeginn nach Akklimatisation der Tiere anhand des Körpergewichts, so dass in allen Gruppen der jeweiligen Studie das mittlere Körpergewicht annähernd identisch war (weight-matched groups).

a) Studie 1

Ziel von Studie 1 war es, den Einfluss einer zehntägigen GH-Gabe bei gesunden, normalgewichtigen Tieren auf die Körpergewichtsentwicklung, den Körperfettanteil, Leptin, und IGF-I zu bestimmen. Hierzu wurden zwölf Tiere auf drei Gruppen à vier Tiere verteilt; das mittlere Gewicht der Tiere betrug bei Beginn der Studie $384,2 \pm 10,6$ g (entsprechend einem Lebensalter von ca. zehn Wochen). Alle drei Gruppen wurden mit Chow gefüttert und erhielten zweimal täglich (jeweils zu Beginn und gegen Ende der zwölfstündigen Dunkelfase) eine Injektion; die Tiere der Gruppe 1 erhielten Injektionen der Kontrollsubstanz (Control), während den Tieren der Gruppen 2 und 3 GH injiziert wurde (s. Tab. 2-3). Die GH-Dosis in Gruppe 2 betrug 0,06 mg/d (GH low dose) und in Gruppe 3 0,6 mg/d (GH high dose), entsprechend einer Dosis von ca. 0,15 mg/kg/d (Gruppe 2) und 1,5 mg/kg/d (Gruppe 3).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Diät	Chow	Chow	Chow
Injektionen	Control (Aqua ad ini.)	GH low dose (0,06 mg/d)	GH high dose (0,6 mg/d)

Tab. 2-3: Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 1

b) Studie 2

In Studie 2 wurde untersucht, ob und in welcher Dosis die Gabe von GH den Einfluss einer LCHFD auf die Entwicklung des Körpergewichts, den Körperfettanteil, Leptin und IGF-I in einem Zeitraum von 16 Tagen kompensiert. Hierzu wurden zwölf gesunde, normalgewichtige Tiere auf drei Gruppen à vier Tiere verteilt; das mittlere Gewicht der Tiere betrug bei Beginn der Studie $371,2 \pm 11,4$ g (entsprechend einem Lebensalter von ca. neun Wochen). Alle Tiere erhielten zwei Mal täglich (jeweils zu Beginn und gegen Ende der zwölfstündigen Dunkelfase) eine Injektion; die Tiere der Gruppe 1 erhielten Injektionen der Kontrollsubstanz (Control) während den Tieren der Gruppen 2 und 3 GH injiziert wurde (s. Tab. 2-4; Dosis in Gruppe 2 ca. 0,15 mg/kg/d [GH low dose] und in Gruppe 3 ca. 1,5 mg/kg/d [GH high dose]). Die Tiere in Gruppe 1 fungierten als Kontrollgruppe und wurden mit Chow gefüttert, während die Tiere in den Gruppen 2 und 3 LCHFD erhielten. Da diese Studie primär der Dosisfindung einer GH-Gabe auf die genannten Endpunkte diente, wurde keine zusätzliche Kontrollgruppe (LCHFD mit Injektionen der Kontrollsubstanz) mitgeführt.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Diät	Chow	LCHFD	LCHFD
Injektionen	Control (Aqua ad ini.)	GH low dose (0,06 mg/d)	GH high dose (0,6 mg/d)

Tab. 2-4: Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 2

c) Studie 3

In dieser Studie wurde an insgesamt 32 gesunden, normalgewichtigen Tieren untersucht, ob sich die bekannten Effekte der LCHFD auf die Entwicklung des Körpergewichts, den Körperfettanteil, Leptin, IGF-I und GH durch die hochdosierte Gabe von GH aufheben lassen. Für diese 16-tägige Studie wurden die Tiere in vier Gruppen à acht Tiere aufgeteilt; das Gewicht der Tiere betrug zu Beginn der Studie $448,3 \pm 23,2$ g, was einem Alter von ca. zwölf Wochen entspricht. Die Gruppen 1 und 2 erhielten Chow und die Gruppen 3 und 4 LCHFD. Alle Tiere erhielten zweimal täglich (jeweils zu Beginn und gegen Ende der zwölfstündigen Dunkelphase) eine Injektion; die Tiere der Gruppen 1 und 3 erhielten Injektionen der Kontrollsubstanz (Control) während den Tieren der Gruppen 2 und 4 GH (0,9 mg/d [GH high dose], entsprechend einer Dosis von ca. 2 mg/kg/d) injiziert wurde (s. Tab. 2-5).

Des Weiteren wurde in dieser Studie bei vier Tieren jeder Gruppe vor Beginn (Baseline) und vor Beendigung der Studie (Post) der Energieumsatz mittels indirekter Kalorimetrie bestimmt. Eine Messung dauerte jeweils 48 Stunden, mit zwei Unterbrechungen (jeweils zu Beginn der Dunkelphase zur Messung des Körpergewichts und zur Injektion). Bei der ersten Unterbrechung wurde den Tieren die komplette Tagesdosis (doppelte Injektion) verabreicht, um den Messvorgang der Kalorimetrie nicht am Ende der Dunkelphase erneut pausieren zu müssen.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Diät	Chow	Chow	LCHFD	LCHFD
Injektionen	Control (Aqua ad ini.)	GH high dose (0,9 mg/d)	Control (Aqua ad ini.)	GH high dose (0,9 mg/d)

Tab. 2-5: Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 3

III Ergebnisse

A Studie 1: Dosisabhängige Effekte von Wachstumshormon unter Chow

1. Entwicklung des Körpergewichts

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 Chow, GH low dose	n	Gruppe 3 Chow, GH high dose	n
Veränderung des Körpergewichts (%)	5,1 ± 0,8	4	6,2 ± 1,6	4	9,5 ± 1,0	4

Tab. 3-1: Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100 %). Mittelwerte ± Standardabweichung

Die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere in Studie 1 ist in Tabelle 3-1 und Abbildung 3-1 dargestellt. In allen Gruppen haben die Tiere ihr Körpergewicht im Verlauf der Studie vergrößert. Beide mit Wachstumshormon behandelten Gruppen weisen im Vergleich zu der mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe einen größeren Zuwachs auf. Der Unterschied der Gewichtszunahme zwischen den Gruppen ist statistisch signifikant ($p = 0,021$). Die Körpergewichtszunahme der mit der geringen Dosis Wachstumshormon behandelten Tiere (Gruppe 2) unterscheidet sich nicht signifikant von der Gewichtsveränderung der mit Kontrollsubstanz behandelten Tiere (Gruppe 1) ($p = 0,386$), jedoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der mit der hohen Dosis Wachstumshormon behandelten Gruppe (Gruppe 3) und der mit Kontrollsubstanz (Gruppe 1) sowie der mit der niedrigen Dosis Wachstumshormon behandelten Gruppe (Gruppe 2) (jeweils $p = 0,020$).

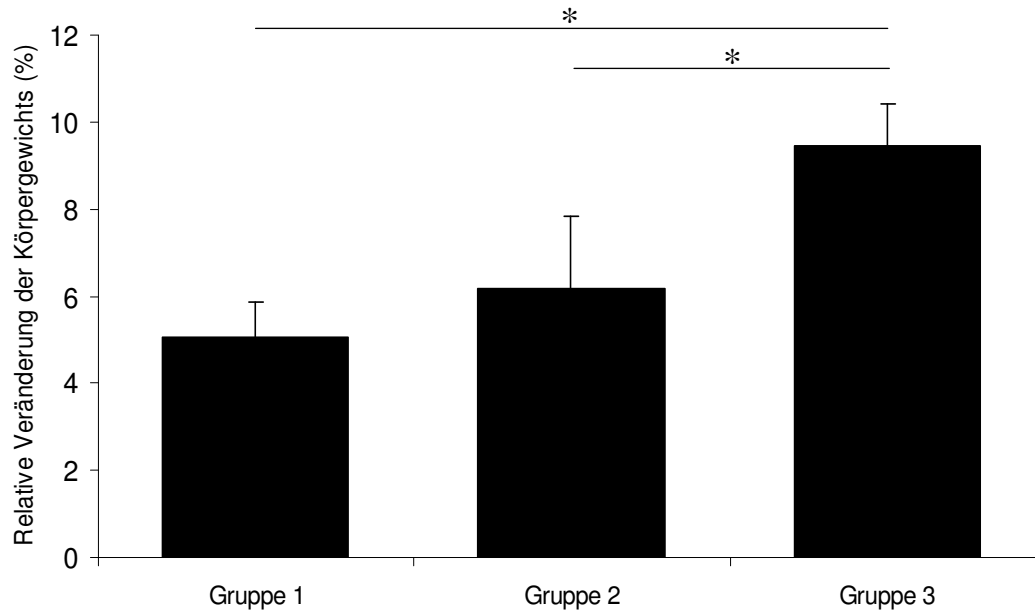


Abb. 3-1: Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100 %). Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$

2. Körperzusammensetzung

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 Chow, GH low dose	n	Gruppe 3 Chow, GH high dose	n
Fettmasse (%)	3,9 ± 0,3	4	4,0 ± 0,3	4	3,9 ± 0,4	4

Tab. 3-2: Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100 %). Mittelwerte ± Standardabweichung

Der durchschnittliche Anteil der Summe der exstirpierten Fettdepots am Gesamtkörpergewicht der Tiere aus Studie 1 ist in Tabelle 3-2 und Abbildung 3-2 dargestellt. In allen 3 Gruppen fand sich ein annähernd identischer Fettanteil. Die geringfügigen Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,735$).

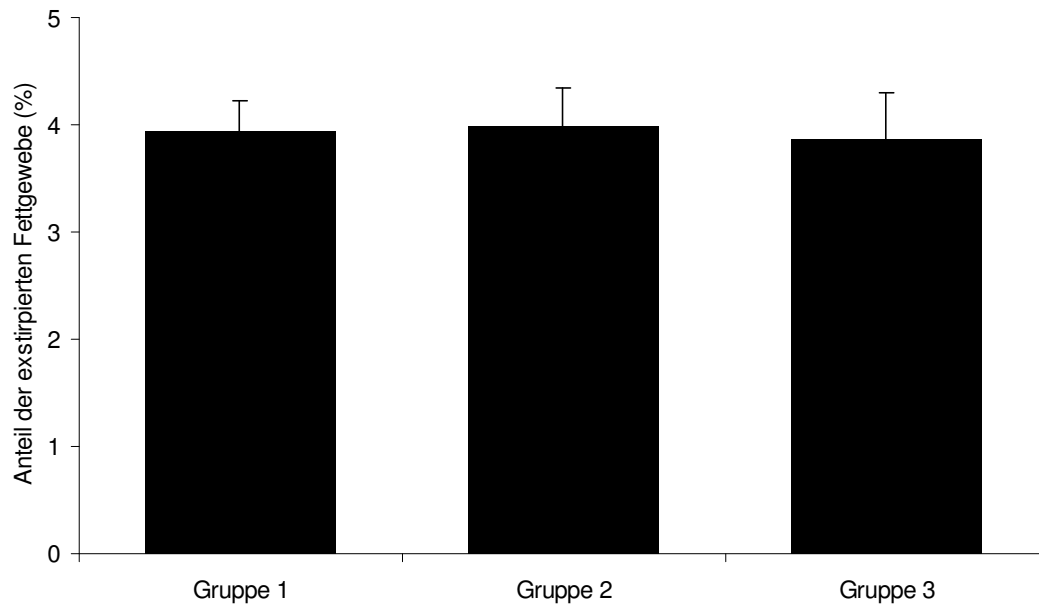


Abb. 3-2: Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100 %). Mittelwerte + Standardabweichung

3. Hormonwerte

a) Leptin

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 Chow, GH low dose	n	Gruppe 3 Chow, GH high dose	n
Leptin (ng/ml)	1,2 ± 0,4	3	0,9 ± 0,4	4	1,1 ± 0,4	3

Tab. 3-3: Mittlere Serumleptinkonzentrationen. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die Serumkonzentrationen von Leptin der drei Gruppen unterscheiden sich geringfügig. Es fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,408$; s. Tab. 3-3 u. Abb. 3-3).

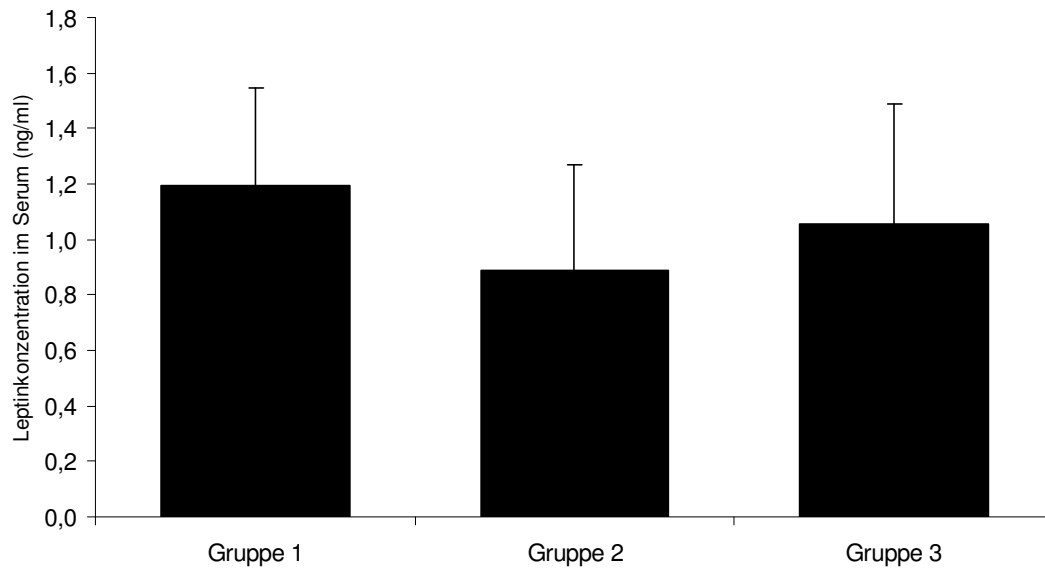


Abb. 3-3: Mittlere Serumleptinkonzentrationen. Mittelwerte + Standardabweichung

b) IGF-I

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 Chow, GH low dose	n	Gruppe 3 Chow, GH high dose	n
IGF-I (ng/ml)	1691,9 ± 242,9	4	1728,4 ± 246,3	4	1750,5 ± 182,1	4

Tab. 3-4: Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die mittleren IGF-I-Werte der Tiere aller 3 Gruppen sind nahezu identisch (Tabelle 3-4 u. Abb. 3-4); die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant ($p=0,874$).

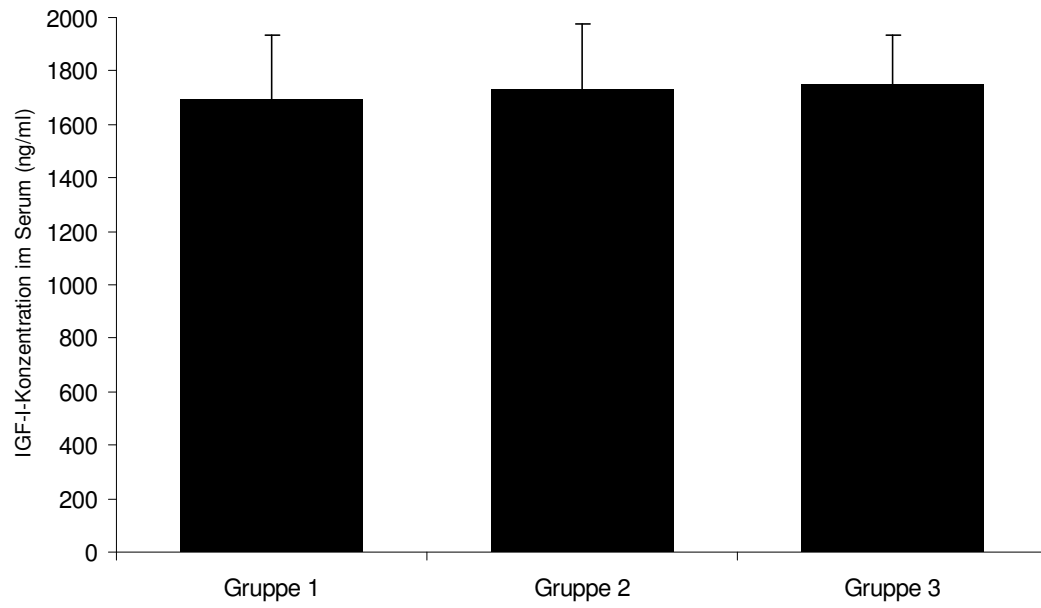


Abb. 3-4: Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum. Mittelwerte + Standardabweichung

B Studie 2: Dosisabhängige Effekte von Wachstumshormon unter LCHFD

1. Entwicklung des Körpergewichts

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 LCHFD, GH low dose	n	Gruppe 3 LCHFD, GH high dose	n
Veränderung des Körpergewichts (%)	12,9 ± 1,7	4	4,5 ± 1,1	4	3,9 ± 1,0	4

Tab. 3-5: Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100 %). Mittelwerte ± Standardabweichung

Die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere in Studie 2 ist in Tabelle 3-5 und Abbildung 3-5 dargestellt. Beide mit Wachstumshormon behandelten und mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppen 2 und 3) weisen eine im Vergleich zu der mit Chow gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) eine deutlich geringere Körpergewichtszunahme auf. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch signifikant ($p = 0,023$). Der Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 ist statistisch signifikant ($p = 0,021$), ebenso der Unterschied zwischen der Gruppe 1 und 3 ($p = 0,021$). Zwischen den beiden mit LCHFD gefütterten Gruppen, die Wachstumshormon in niedriger (Gruppe 2) und hoher (Gruppe 3) Dosis injiziert bekamen, besteht kein signifikanter Unterschied ($p = 0,564$).

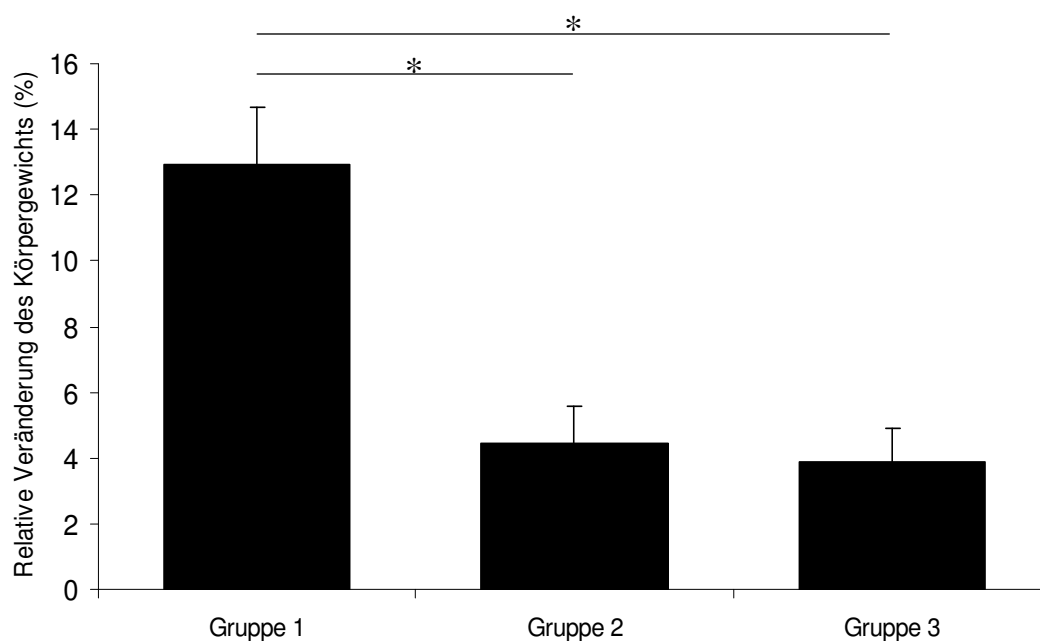


Abb. 3-5: Mittlere Veränderung des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100 %). Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$

2. Körperzusammensetzung

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 LCHFD, GH low dose	n	Gruppe 3 LCHFD, GH high dose	n
Fettmasse (%)	3,8 ± 0,4	4	4,2 ± 0,4	4	3,7 ± 0,7	4

Tab. 3-6: Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100 %). Mittelwerte ± Standardabweichung

Der durchschnittliche Anteil der Summe der exstirpierten Fettdepots am Gesamtkörpergewicht der Tiere aus Studie 2 ist in Tabelle 3-6 und Abbildung 3-6 dargestellt. Zwischen den beiden mit GH behandelten, mit LCHFD-gefütterten Gruppen und der mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,531$).

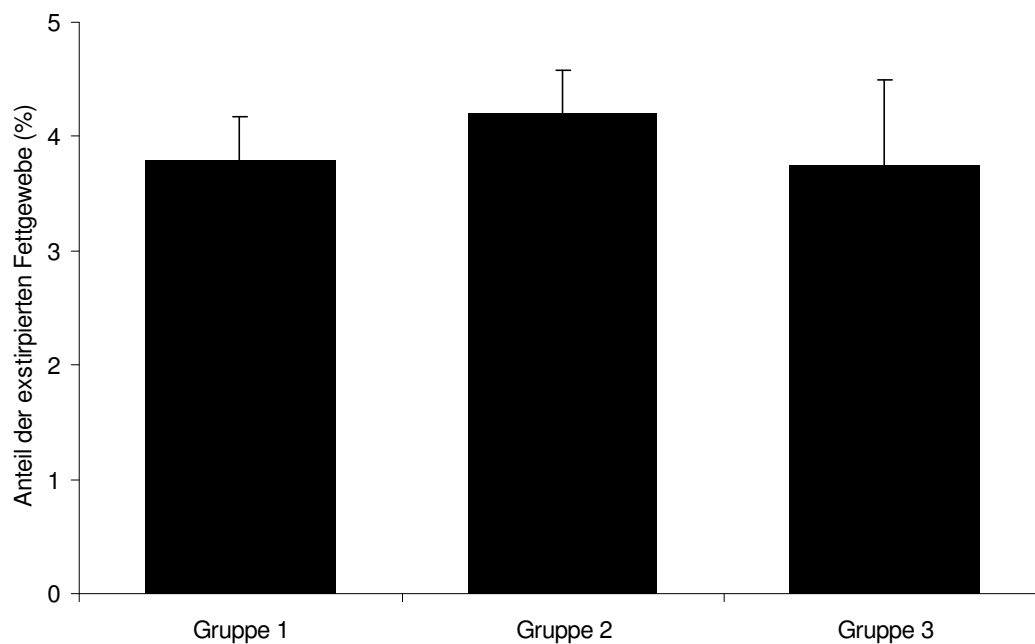


Abb. 3-6: Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100 %). Mittelwerte + Standardabweichung.

3. Hormonwerte

a) Leptin

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 LCHFD, GH low dose	n	Gruppe 3 LCHFD, GH high dose	n
Leptin (ng/ml)	0,8 ± 0,3	3	1,8 ± 0,3	4	2,1 ± 0,7	4

Tab. 3-7: Mittlere Serumleptinkonzentrationen. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die mit Chow gefütterte und mit Kontrollsubstanz behandelte Gruppe (Gruppe 1) weist deutlich niedrigere Leptinkonzentrationen im Serum als die beiden mit LCHFD gefütterten und mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 3) auf. Die durchschnittliche Serumleptinkonzentration der mit der hohen Dosis Wachstumshormon behandelten Gruppe (Gruppe 3) liegt etwas höher als die der mit der niedrigeren Dosis behandelten Tiere (Gruppe 2) (s. Tab 3-7 u. Abb. 3-7). Die statistische Analyse dieser Leptinkonzentrationen zeigt einen gerade signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,049$). Der Unterschied zwischen den Gruppen 1 und 2 ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,057$), der Unterschied zwischen Gruppe 1 und Gruppe 3 hingegen ist signifikant ($p = 0,034$). Die beiden mit LCHFD gefütterten und mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 3) weisen einen geringen, statistisch nicht signifikanten Unterschied auf ($p = 0,773$).

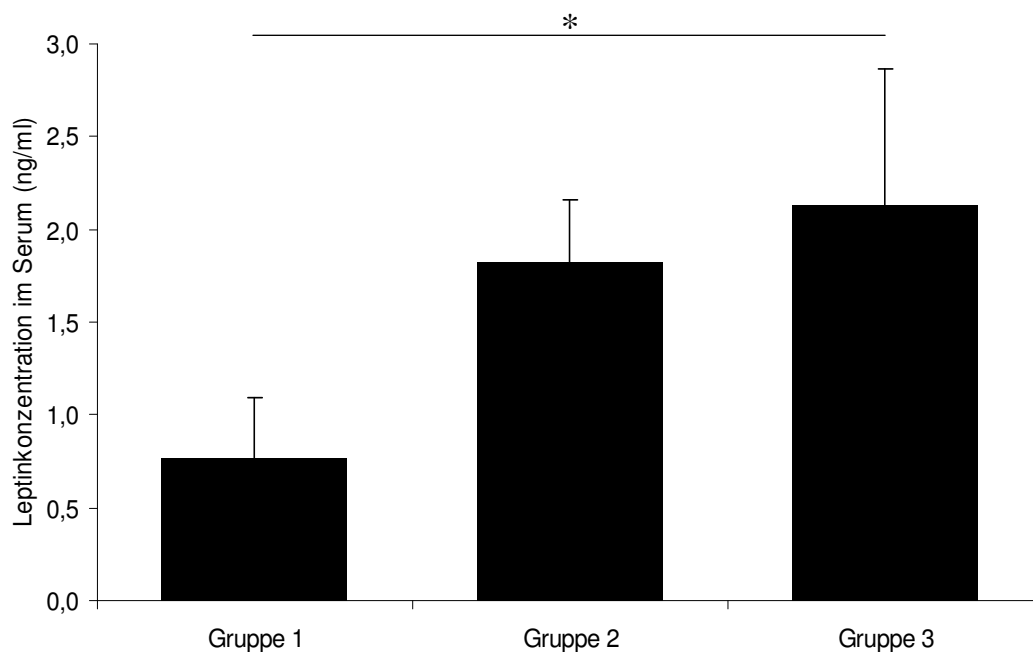


Abb. 3-7: Mittlere Serumleptinkonzentrationen. Mittelwerte + Standardabweichung. * $p < 0,05$

b) IGF-I

	Gruppe 1 Chow, Control	n	Gruppe 2 LCHFD, GH low dose	n	Gruppe 3 LCHFD, GH high dose	n
IGF-I (ng/ml)	1568,8 ± 186,4	4	1117,3 ± 54,2	4	1066,0 ± 264,9	4

Tab. 3-8: Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die Mittelwerte der IGF-I-Konzentrationen im Serum der 3 Gruppen dieser Studie sind in Tabelle 3-8 und Abbildung 3-8 dargestellt; sie unterscheiden sich statistisch signifikant ($p = 0,025$). Die mit Chow gefütterte und mit Kontrollsubstanz behandelte Gruppe 1 weist die höchste durchschnittliche IGF-I-Konzentration auf und unterscheidet sich sowohl von der mit LCHFD gefütterten und mit der niedrigen Dosis Wachstumshormon behandelten Gruppe 2 ($p = 0,029$) als auch von der mit LCHFD gefütterten und mit der hohen Dosis Wachstumshormon behandelten Gruppe 3 ($p = 0,029$) signifikant. Zwischen den beiden mit LCHFD gefütterten und mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 3) besteht ein minimaler Unterschied, der statistisch nicht signifikant ist ($p = 1,000$).

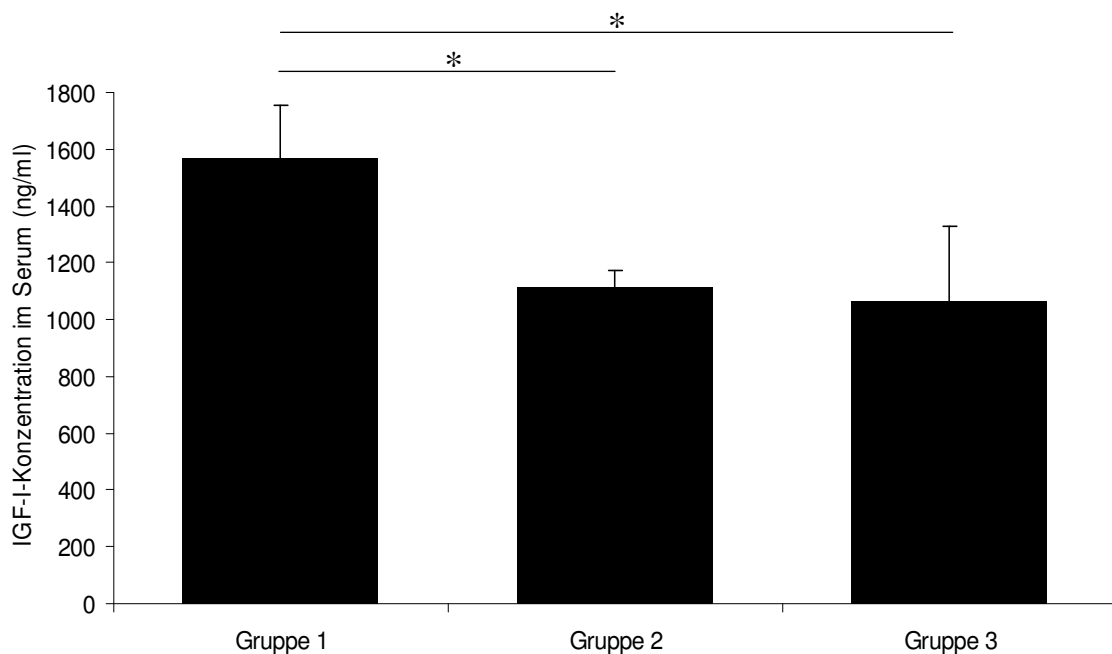


Abb. 3-8: Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum. Mittelwerte + Standardabweichung.
* $p < 0,05$

C Studie 3: Vergleich der Effekte von Wachstumshormon unter Chow und LCHFD

1. Entwicklung des Körpergewichts

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	8	8	8	8
Veränderung des Körpergewichts (%)	5,8 ± 1,2	16,4 ± 2,4	1,2 ± 1,4	-2,8 ± 3,6

Tab. 3-9: Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100%). Medianwerte ± Standardabweichung

Die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere in Studie 3 ist in Tabelle 3-9 und Abbildung 3-9 dargestellt. Zwischen den Gruppen besteht ein statistisch hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$). Alle Gruppen außer der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe weisen einen Zuwachs des mittleren Körpergewichts auf. In der mit Chow ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 2) ist die Zunahme am höchsten.

Alle Tiere der beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppen 1 und 2) haben ihr Körpergewicht gesteigert, wobei in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe (Gruppe 2) ein größerer Gewichtszuwachs als in der mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) zu verzeichnen ist; der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist hochsignifikant ($p = 0,001$). Gruppe 1 unterscheidet sich zudem von der anderen mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 3) hochsignifikant ($p < 0,001$). Auch der Unterschied der beiden mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 4) ist hochsignifikant ($p < 0,001$), wobei die mit Chow gefütterte Gruppe (Gruppe 2) von allen Gruppen den höchsten Gewichtszuwachs verzeichnet und die Tiere der mit LCHFD gefütterten Gruppe (Gruppe 4) als einzige ihr mittleres Gewicht reduziert haben. Die andere mit LCHFD gefütterte Gruppe (Gruppe 3), die mit Kontrollsubstanz behandelt wurde, hat im Mittel ihr Körpergewicht geringfügig vermehrt, weist jedoch zu der mit Wachstumshormon behandelten und mit LCHFD gefütterten Gruppe (Gruppe 4) keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0,141$). Der Unterschied zwischen der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 4) und der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) ist hochsignifikant ($p = 0,001$).

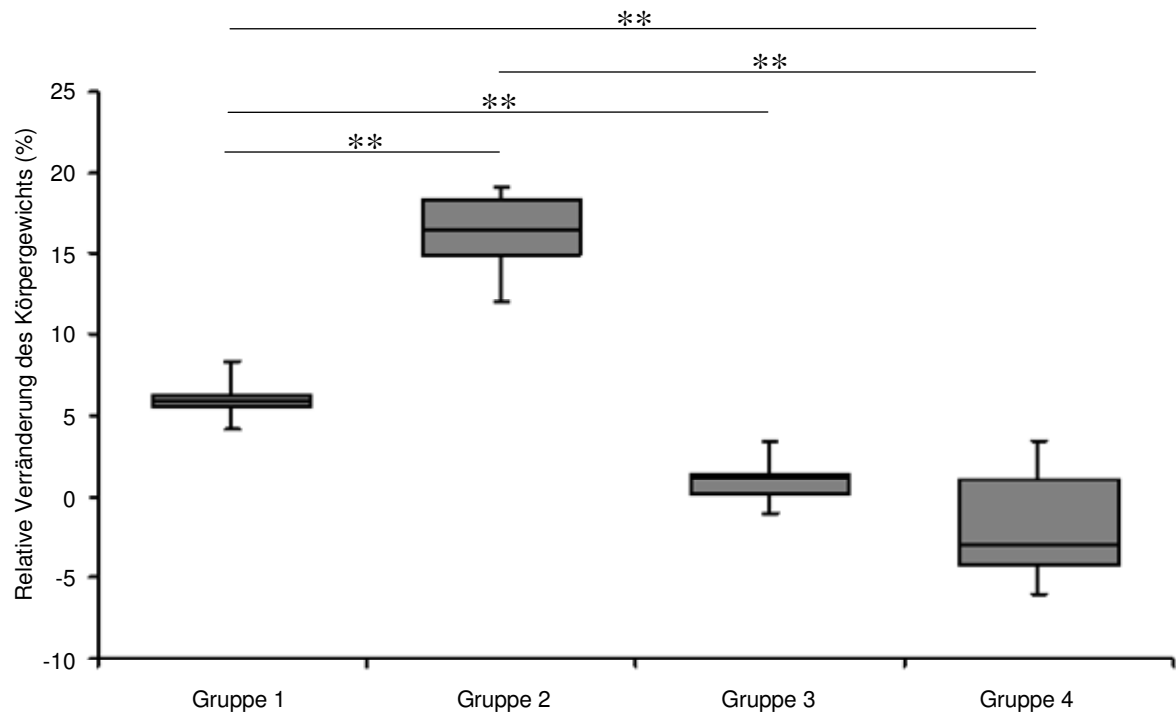


Abb. 3-9: Box-Whisker-Plot der Veränderung des Körpergewichts relativ zur Basalmessung (definiert als 100 %). Die obere Begrenzung eines Kastens (Box) entspricht dem ersten Quartil, der Strich in den Kästen stellt den Median dar und die untere Begrenzung eines Kastens entspricht dem dritten Quartil. Die von dem Kasten ausgehenden Linien (Whisker) enden nach oben beim Maximum und nach unten beim Minimum. ** $p < 0,01$

2. Körperzusammensetzung

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	8	8	7	8
Fettmasse (%)	5,1 ± 1,0	4,8 ± 0,8	6,3 ± 0,5	4,9 ± 1,0

Tab. 3-10: Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100%). Medianwerte ± Standardabweichung

Der mittlere Anteil der Summe der exstirpierten Fettdepots am Gesamtkörpergewicht der Tiere aus Studie 3 ist in Tabelle 3-10 und Abbildung 3-10 dargestellt. Zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,012$).

Während sich die beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppen 1 und 2) nicht signifikant unterscheiden ($p = 0,6$), ist der Unterschied zwischen den mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppen 3 und 4) signifikant, wobei die mit Kontrollsubstanz

behandelte Gruppe (Gruppe 3) den höchsten Fettanteil aller Gruppen aufweist ($p = 0,011$). Diese Gruppe unterscheidet sich auch von der anderen mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) signifikant ($p = 0,015$). Die beiden mit GH behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 4) unterscheiden sich nicht signifikant ($p = 0,834$). Der Unterschied zwischen der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 4) und der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) ist minimal und statistisch nicht signifikant ($p = 0,674$).

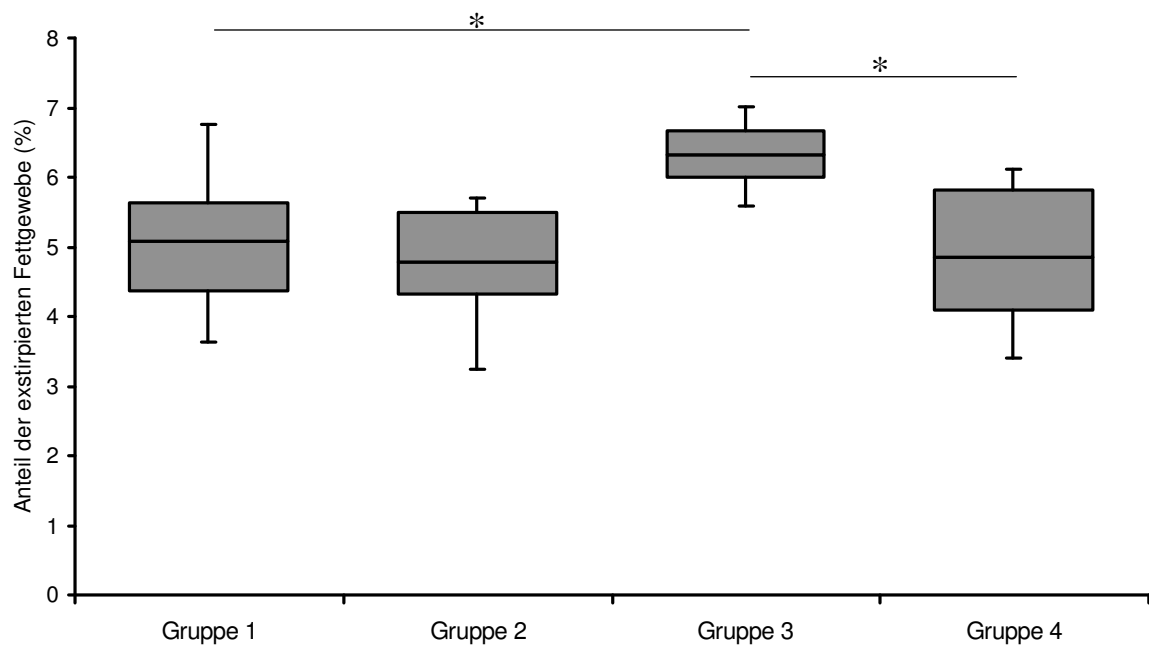


Abb. 3-10: Box-Whisker-Plot der Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht (definiert als 100 %). Die obere Begrenzung eines Kastens (Box) entspricht dem ersten Quartil, der Strich in den Kästen stellt den Median dar und die untere Begrenzung eines Kastens entspricht dem dritten Quartil. Die von dem Kasten ausgehenden Linien (Whisker) enden nach oben beim Maximum und nach unten beim Minimum. * $p < 0,05$

3. Hormonwerte

a) Leptin

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	8	8	7	8
Leptin (pg/ml)	1017,2 ± 579,1	1032,4 ± 442,8	1944,2 ± 677,4	1119,5 ± 727,6

Tab. 3-11: Mittlere Serumleptinkonzentrationen. Medianwerte ± Standardabweichung

Die mittleren Serumleptinkonzentrationen der vier Gruppen sind in Tabelle 3-11 und Abbildung 3-11 dargestellt. Während die Gruppen 1, 2 und 4 ähnliche Werte aufweisen, liegt der Wert der mit LCHFD gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 3) höher. Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,035$).

Während sich die beiden mit Chow gefütterten Gruppen statistisch nicht signifikant unterscheiden ($p = 1,000$), besteht zwischen den beiden mit LCHFD gefütterten Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p = 0,028$). Überdies ist der Unterschied zwischen der mit LCHFD gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 3) und der mit Chow gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) statistisch signifikant ($p = 0,015$). Die mit LCHFD ernährte und mit GH behandelte Gruppe (Gruppe 4) unterscheidet sich von der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) kaum; es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,916$).

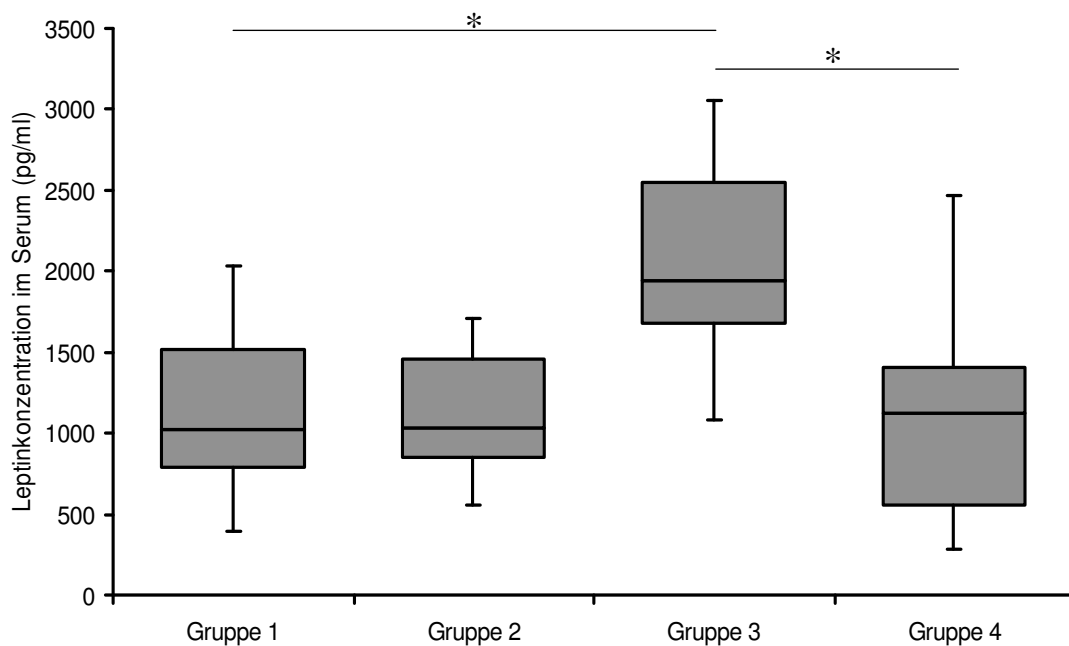


Abb. 3-11: Box-Whisker-Plot der Serumleptinkonzentrationen. Die obere Begrenzung eines Kastens (Box) entspricht dem ersten Quartil, der Strich in den Kästen stellt den Median dar und die untere Begrenzung eines Kastens entspricht dem dritten Quartil. Die von dem Kasten ausgehenden Linien (Whisker) enden nach oben beim Maximum und nach unten beim Minimum. * $p < 0,05$

b) IGF-I

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	8	8	8	8
IGF-I (ng/ml)	1478,2 ± 166,7	1568,9 ± 138,3	1047,2 ± 126,9	1110,5 ± 223,7

Tab. 3-12: Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum. Medianwerte ± Standardabweichung

Die IGF-I-Serumkonzentrationen der vier Gruppen sind in Tabelle 3-12 und Abbildung 3-12 dargestellt. Beide mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppen 3 und 4) weisen im Vergleich zu den mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppen 1 und 2) reduzierte IGF-I-Werte auf. Der Unterschied zwischen den 4 Gruppen ist statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$). Zwischen den beiden mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppen (Gruppen 1 und 3) besteht ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,002$), ebenso zwischen den beiden mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppe 2 und Gruppe 4) ($p=0,007$). Die Unterschiede zwischen den mit gleichem Futter gehaltenen Tieren sind nicht signifikant. Weder die beiden mit Chow ernährten Gruppen (Gruppe 1 und 2) unterscheiden sich signifikant ($p = 0,172$), noch besteht zwischen den mit LCHFD ernährten Gruppen (Gruppe 3 und 4) ein signifikanter Unterschied ($p = 0,505$). Zwischen der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 4) und der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) besteht bezüglich ihrer mittleren IGF-I-Serumkonzentrationen ein hochsignifikanter Unterschied ($p = 0,016$).

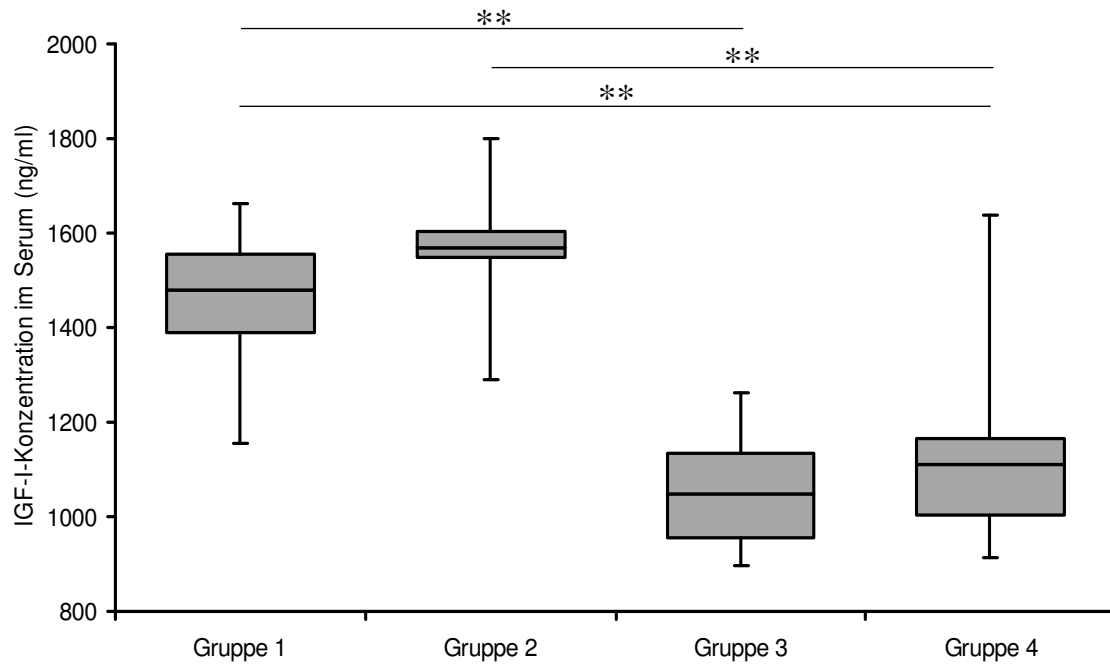


Abb. 3-12: Box-Whisker-Plot der IGF-I-Konzentrationen im Serum. Die obere Begrenzung eines Kastens (Box) entspricht dem ersten Quartil, der Strich in den Kästen stellt den Median dar und die untere Begrenzung eines Kastens entspricht dem dritten Quartil. Die von dem Kasten ausgehenden Linien (Whisker) enden nach oben beim Maximum und nach unten beim Minimum. ** $p < 0,01$

c) GH

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	7	7	7	8
GH (ng/ml)	80,4 ± 96,0	51,4 ± 76,3	65,9 ± 94,2	300,5 ± 317,2

Tab. 3-13: Mittlere GH-Konzentrationen im Serum. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die mit LCHFD gefütterte und mit humanem Wachstumshormon behandelte Gruppe (Gruppe 4) weist im Vergleich zu den anderen Gruppen einen erhöhten mittleren Spontanwert für Nager-Wachstumshormon auf (s. Tab. 3-13 u. Abb. 3-13). Der Unterschied zwischen den Gruppen ist nicht signifikant ($p = 0,171$).

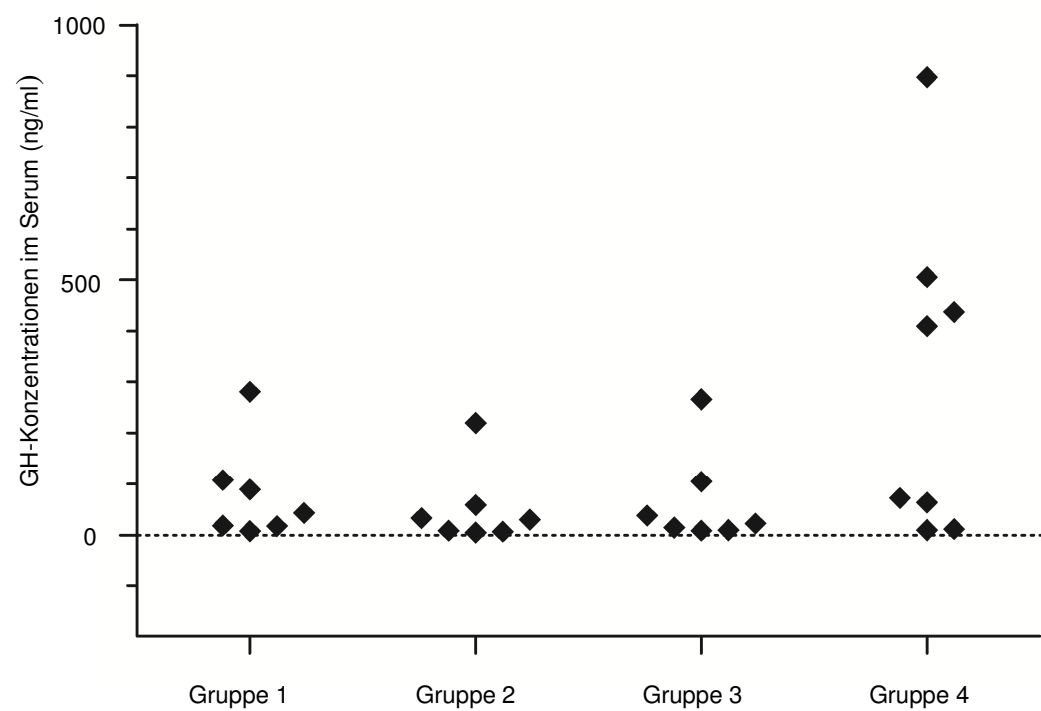


Abb. 3-13: GH-Konzentrationen im Serum

4. Kalorimetrische Parameter

a) Respiratorischer Quotient

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	4	4	4	4
Baseline RQ	1,01 ± 0,03	1,03 ± 0,03	1,03 ± 0,04	1,03 ± 0,03
Post RQ	1,05 ± 0,03	1,05 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,85 ± 0,03
Veränderung des RQ	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,03	-0,17 ± 0,05	-0,17 ± 0,03

Tab. 3-14: Mittlere RQ in der Lichtphase. Mittelwerte ± Standardabweichung

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	4	4	4	4
Baseline RQ	1,05 ± 0,03	1,07 ± 0,02	1,07 ± 0,03	1,07 ± 0,01
Post RQ	1,06 ± 0,02	1,08 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01
Veränderung des RQ	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	-0,24 ± 0,03	-0,25 ± 0,01

Tab. 3-15: Mittlere RQ in der Dunkelphase. Mittelwerte ± Standardabweichung

Die Werte der RQ aus Studie 3 sind in Tabelle 3-14 und Abbildung 3-14 (Lichtphase) und in Tabelle 3-15 und Abbildung 3-15 (Dunkelphase) dargestellt.

Bei den Messungen während der Lichtphase zeigt sich im Verlauf der Studie eine Abnahme des respiratorischen Quotienten in den mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppen 3 und 4), während die respiratorischen Quotienten der beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppen 1 und 2) minimal zunehmen. Die statistische Analyse ergab einen hochsignifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen ($p = 0,009$) bezüglich der Veränderungen des respiratorischen Quotienten.

Signifikant ist der Unterschied dieser Veränderungen der beiden mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppen (Gruppe 1 und 3; $p = 0,020$) sowie zwischen den beiden mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 4; $p = 0,020$). Zwischen den beiden Gruppen, die jeweils dieselbe Diät erhielten, sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant: Weder die beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppe 1 und 2; $p = 0,486$), noch die mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppe 3 und 4; $p = 1,000$) weisen signifikante Unterschiede auf. Die Abnahme des RQ in der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 4) stellt im Vergleich zu der Veränderung des RQ in der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) eine signifikante Veränderung dar ($p = 0,019$).

Ein ähnliches Bild ergab die Analyse der Veränderungen der während der Dunkelphase gemessenen respiratorischen Quotienten. Während in den beiden mit LCHFD gefütterten Gruppen 3 und 4 die respiratorischen Quotienten im Lauf der Studie sanken, blieben die Werte in den mit Chow gefütterten Gruppen annähernd konstant. Eine statistische Analyse

der Veränderungen des RQ ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,010$). Wie während der Lichtphase, ist auch hier der Unterschied dieser Veränderungen der beiden mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppen (Gruppe 1 und 3) signifikant ($p = 0,029$), ebenso der zwischen den beiden mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppe 2 und 4; $p = 0,029$). Ebenso sind die Unterschiede in dieser Phase zwischen den beiden Gruppen, die jeweils dieselbe Diät erhielten, statistisch nicht signifikant: Weder die beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppe 1 und 2; $p = 1,000$), noch die mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppe 3 und 4; $p = 0,886$) weisen signifikante Unterschiede auf. Die Abnahme des RQ in der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe stellt auch hier, wie in der Lichtphase, im Vergleich zur mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe eine signifikante Veränderung dar ($p = 0,021$).

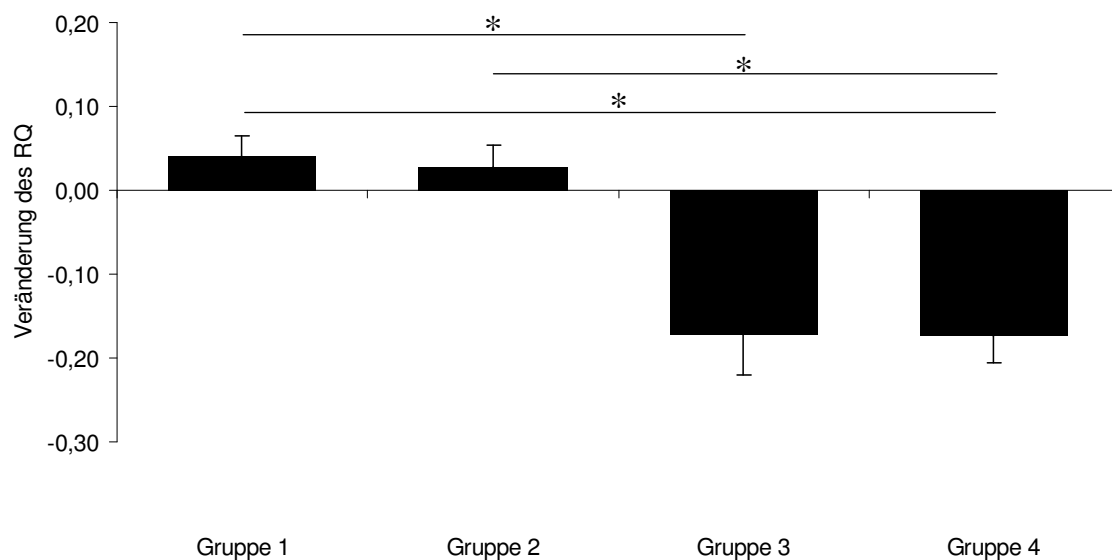


Abb. 3-14: Mittlere Veränderungen des RQ in der Lichtphase.
Mittelwerte + bzw. - Standardabweichung. * $p < 0,05$

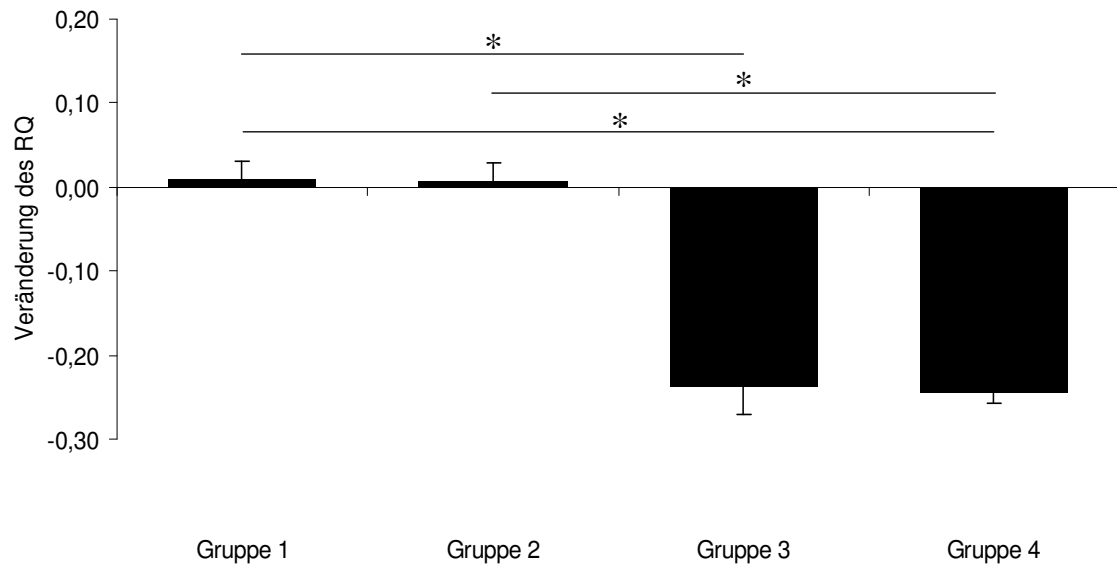


Abb. 3-15: Mittlere Veränderungen des RQ in der Dunkelphase. Mittelwerte + bzw. - Standardabweichung. * $p < 0,05$

b) Energieumsatz

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	4	4	4	4
Baseline Energieumsatz (kcal/kg/h)	4,73 ± 0,18	5,00 ± 0,16	4,83 ± 0,21	5,04 ± 0,19
Post Energieumsatz (kcal/kg/h)	4,53 ± 0,08	4,98 ± 0,10	4,51 ± 0,23	5,13 ± 0,47
Veränderung des Energieumsatzes (kcal/kg/h)	-0,19 ± 0,12	-0,01 ± 0,16	-0,33 ± 0,15	0,09 ± 0,62

Tab. 3-16: Mittlere Energieumsätze in der Lichtphase. Mittelwerte ± Standardabweichung

Gruppe	1 Chow, Control	2 Chow, GH high dose	3 LCHFD, Control	4 LCHFD, GH high dose
n	4	4	4	4
Baseline Energieumsatz (kcal/kg/h)	6,30 ± 0,23	6,61 ± 0,06	6,39 ± 0,27	6,24 ± 0,15
Post Energieumsatz (kcal/kg/h)	6,28 ± 0,38	6,51 ± 0,16	5,94 ± 0,31	6,82 ± 0,46
Veränderung des Energieumsatzes (kcal/kg/h)	-0,01 ± 0,27	-0,10 ± 0,20	-0,45 ± 0,20	0,58 ± 0,39

Tab. 3-17: Mittlere Energieumsätze in der Dunkelphase. Mittelwerte ± Standardabweichung

Der Energieumsatz der Tiere aus Studie 3 sind in Tabelle 3-16 und Abbildung 3-16 (Lichtphase) sowie in Tabelle 3-17 und Abbildung 3-17 (Dunkelphase) dargestellt.

Die Messungen während der Lichtphase zeigen im Verlauf der Studie eine Abnahme des Energieumsatzes in den Gruppen 1, 2 und 3. Die mit Wachstumshormon behandelte und mit LCHFD gefütterte Gruppe 4 hingegen weist als einzige eine Zunahme des Energieumsatzes auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,231$).

Ebenso hat der Energieumsatz während der Dunkelphase im Lauf der Studie in den Gruppen 1, 2 und 3 abgenommen, während er einzig in Gruppe 4 zugenommen hat. In dieser Phase sind die Unterschiede zwischen den Gruppen statistisch signifikant ($p = 0,013$). Beide Gruppen, die mit Kontrollsubstanz behandelt wurden (Gruppen 1 und 3), weisen eine Verringerung des Energieumsatzes auf, wobei in der mit LCHFD gefütterten Gruppe der stärkste Rückgang des Energieumsatzes zu verzeichnen ist; die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant ($p = 0,043$). Auch zwischen den beiden mit Wachstumshormon behandelten Gruppen (Gruppen 2 und 4) besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,043$), wobei die mit Chow gefütterte Gruppe ihren Energieumsatz geringgradig verringert hat und die mit LCHFD gefütterte Gruppe einen deutlichen Zuwachs des Energieumsatzes aufweist. Bei beiden mit Chow gefütterten Gruppen (Gruppen 1 und 2) ist eine Abnahme des Energieumsatzes zu verzeichnen; der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,564$). Hingegen ist der Unterschied zwischen den beiden mit LCHFD gefütterten Gruppen (Gruppen 3 und 4) statistisch signifikant ($p = 0,021$); während die Tiere der mit Kontrollsubstanz

behandelten Gruppe 3 eine Verringerung des Energieumsatzes aufweisen, hat sich der Energieumsatz der mit GH behandelten Tiere in Gruppe 4 erhöht. Diese Erhöhung des Energieumsatzes der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe (Gruppe 4) unterscheidet sich von der mit Chow ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe (Gruppe 1) signifikant ($p = 0,043$).

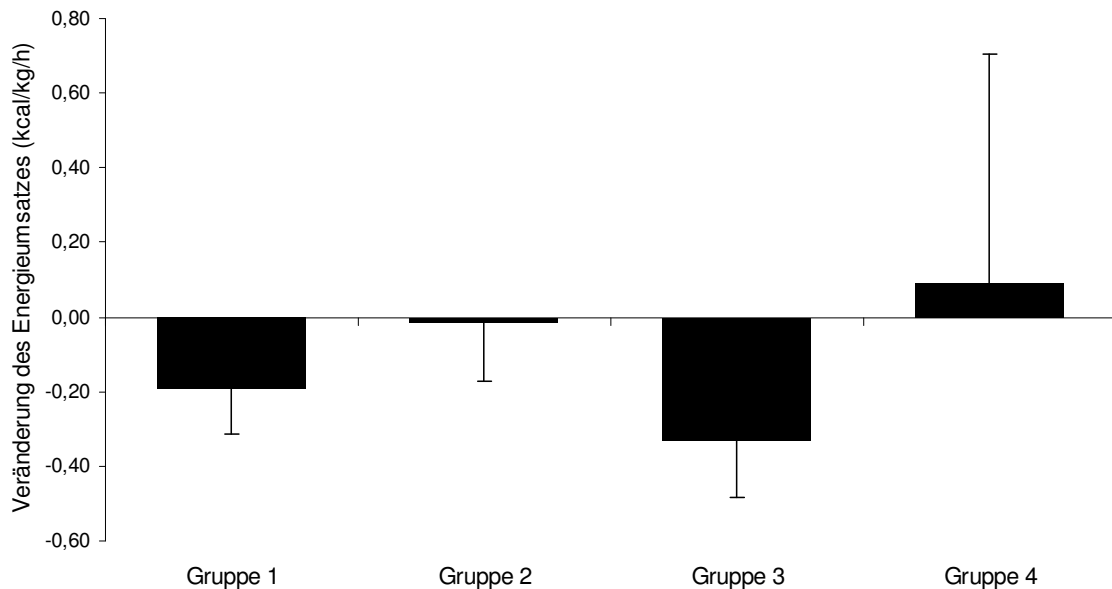


Abb. 3-16: Mittlere Veränderungen des Energieumsatzes in der Lichtphase. Mittelwerte + bzw. – Standardabweichung

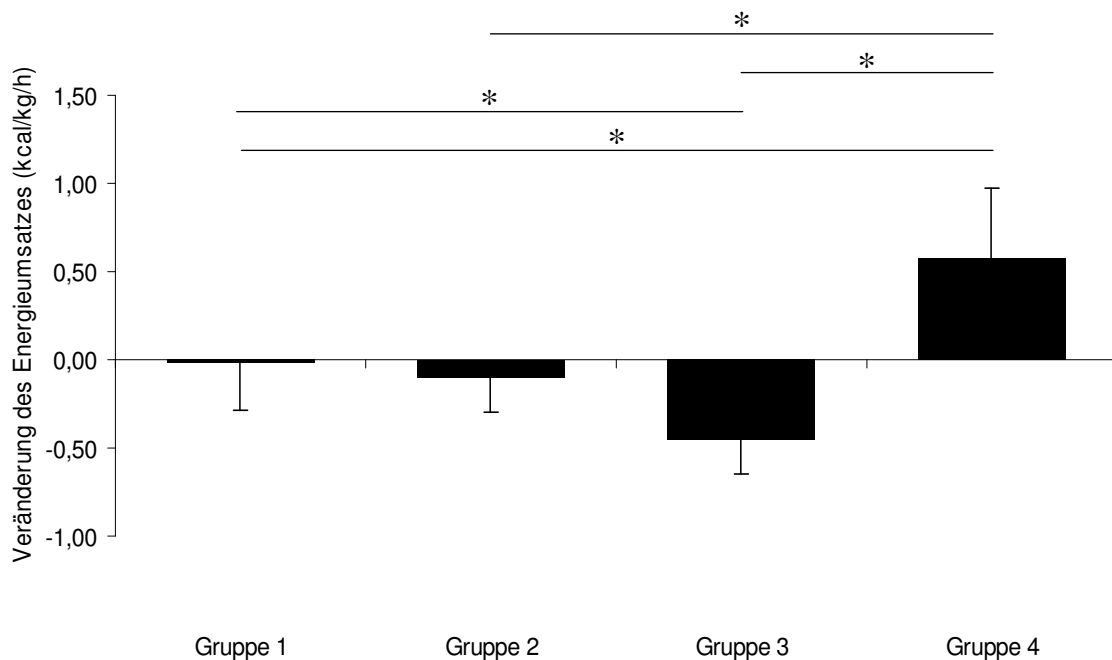


Abb. 3-17: Mittlere Veränderungen des Energieumsatzes in der Dunkelphase. Mittelwerte + bzw. – Standardabweichung. * $p < 0,05$

IV Diskussion

Ziel der Studien war die Untersuchung des Einflusses der Gabe von GH auf physiologische Effekte, die eine LCHFD nach vorausgegangenen Experimenten auf die Körpergewichtsentwicklung, die Körperzusammensetzung, sowie die zirkulierenden Leptin- und IGF-I-Konzentrationen bei Ratten hat. Außerdem wurde der Einfluss einer LCHFD mit und ohne GH-Gabe auf den respiratorischen Quotienten, den Energieumsatz und die Serumkonzentration von GH ermittelt.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit waren:

- Die unter Fütterung einer LCHFD erniedrigten Serumkonzentrationen von IGF-I waren durch die Gabe von GH nicht anzuheben.
- Die unter LCHFD beobachtete retardierte Körpergewichtsentwicklung konnte durch die Gabe von GH nicht normalisiert werden.
- Der unter LCHFD erhöhte Körperfettanteil konnte durch die Gabe von GH erniedrigt werden.
- Die Verminderung des Energieumsatzes unter Fütterung einer LCHFD konnte durch die Gabe von GH während der Dunkelphase kompensiert werden.

1. Ergebnisse der Pilotstudien

In den Pilotstudien wurden die Grundlagen für das Hauptexperiment geschaffen. Es konnte gezeigt werden, dass das verabreichte GH-Präparat im verwendeten Nagermodell wirksam ist. So zeigten die Tiere in Studie 1 unter GH-Gabe sowohl in der niedrigeren (Gruppe 2) als auch in der höheren Dosis (Gruppe 3) einen deutlichen, statistisch signifikanten Gewichtszuwachs. In dieser Studie konnten jedoch keine signifikanten Effekte der GH-Gabe auf die Körperzusammensetzung und die Serumkonzentrationen von IGF-I und Leptin beobachtet werden. In Studie 2 gelang es, durch die Gabe von GH den chirurgisch bestimmten Körperfettanteil der mit LCHFD gefütterten Tiere auf das Niveau der mit Chow gefütterten Tiere zu senken. Ferner zeigte sich, dass die Wirkungen der LCHFD auf die Körpergewichtsentwicklung sowie auf die Serumkonzentrationen von IGF-I und Leptin durch die verabreichten GH-Dosen (0,06 mg/d bzw. 0,6 mg/d) nicht merklich beeinflusst werden konnten. Aus diesem Grund wurde in Studie 3 in den mit GH behandelten Gruppen eine höhere Dosis (0,9 mg/d) injiziert.

2. Entwicklung des Körpergewichts

In allen Studien war ein deutlicher, statistisch (hoch)signifikanter, anaboler Effekt des verabreichten GHs unter Chow zu sehen. Diese Stimulation des Wachstums durch GH wird klinisch seit Jahrzehnten im Rahmen der Therapie einer GH-Defizienz erfolgreich angewendet (Mauras 2009).

Im Vergleich hierzu war die Entwicklung des Körpergewichts der mit LCHFD ernährten Tiere retardiert. Dieser Befund gleicht den Ergebnissen unserer Vorarbeiten bei Nagern und den Beobachtungen zur Wachstumsentwicklung bei Kindern, die aufgrund schwerer Epilepsien eine LCHFD einhalten müssen (Vining et al. 2002; Groesbeck et al. 2006; Bielohuby et al. 2009; Caton et al. 2009). Bemerkenswert ist, dass diese Beeinträchtigung der Gewichtszunahme in den Studien 2 und 3 unter einer Fütterung mit LCHFD durch die Gabe von GH nicht zu beheben war – die Entwicklung des Körpergewichts unter LCHFD ließ sich durch die GH-Injektionen nicht stimulieren.

3. Körperzusammensetzung

Die von uns bereits mehrfach beobachtete Erhöhung des Körperfettanteils trotz Abnahme des Gesamtkörpergewichts unter einer Fütterung von LCHFD konnte bestätigt werden; im Hauptexperiment führte die Zufuhr von LCHFD ohne GH-Injektion im Vergleich zu der mit Chow gefütterten Gruppe (ebenfalls ohne GH) zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils der exstirpierten Fettdepots am Gesamtkörpergewicht (Caton et al. 2009). Der Versuch, diese durch die LCHFD bedingte relative Erhöhung des Körperfetts durch die Verabreichung von GH abzuwenden, gelang. Der chirurgisch bestimmte Anteil des Körperfetts war in der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe im Vergleich zu der mit LCHFD ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe signifikant erniedrigt. In klinischen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sowohl erhöhte Spiegel von endogenem Wachstumshormon (bei Akromegalie) als auch therapeutisch verabreichtes Wachstumshormon (z. B. bei GH-Defizienz) den Körperfettanteil reduziert, wobei die Wirkung auf viszerales Fett am ausgeprägtesten erscheint (Chrisoulidou et al. 2000; Nam et al. 2001; Cummings und Merriam 2003; Pasarica et al. 2007; Freda et al. 2008).

Der lipolytische Effekt der GH-Gabe konnte bei einer Fütterung mit Chow in keiner der Studien gezeigt werden. Gemäß des Wirkmechanismus von GH wäre prinzipiell ein solcher Effekt auch unter Chow zu erwarten (Carrel und Allen 2000). Es ist zu berücksichtigen, dass GH-defiziente Patienten, die in klinischen Studien durch die Gabe

von GH eine Steigerung der Lipolyse erfahren, vor der Behandlung, wie auch die mit LCHFD gefütterten Nager, eine erhöhte Fettmasse aufweisen. Der Körperfettanteil der mit Chow gefütterten Tiere hingegen ist a priori nicht erhöht, was vermutlich begründet, warum in dieser Gruppe kein lipolytischer Effekt erzielt werden kann.

Es ist möglich, dass die Summe der chirurgisch entfernten epididymalen, perirenal und inguinalen Fettdepots nicht repräsentativ für das Gesamtkörperfett ist. Da jedoch in den Studien 1 und 3 die durchschnittlichen Anteile der exstirpierten Fettdepots in ihrer Verteilung den Serumleptinspiegeln, deren hauptsächliche Bestimmungsgröße der Körperfettanteil ist, stark ähneln, ist von einer positiven Korrelation des Gewichtsanteils der exstirpierten Fettdepots und des Körperfettanteils auszugehen (Considine et al. 1996; Ostlund et al. 1996; Friedman und Halaas 1998). So entsprechen die im Vergleich zu den anderen Gruppen des Hauptexperiments signifikant höheren Leptinwerte in der mit LCHFD gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe dem signifikant höheren Anteil der exstirpierten Fettgewebe am Körpergewicht in dieser Gruppe. Auch in Studie 1 entspricht das Ergebnis der Bestimmung der Leptinkonzentrationen im Serum dem Ergebnis des chirurgischen Verfahrens, welches sich ferner im Schrifttum als Methode zur Messung des Körperfettanteils in vergleichbaren Tiermodellen findet (Kinzig und Taylor 2009). Darüberhinaus konnten wir im Rahmen einer nachfolgenden Studie zeigen, dass der durch chirurgische Entfernung von Fettdepots ermittelte Körperfettanteil mit dem magnetresonanztomographisch bestimmten Körperfettanteil positiv korreliert (Caton et al. 2012). Die Diskrepanz des durch chirurgische Entfernung der Fettdepots bestimmten Körperfettanteils mit den mittleren Serumleptinkonzentrationen in Studie 2 ist somit am ehesten auf die relativ geringe Fallzahl in dieser Pilotstudie zurückzuführen. Überdies ist zu beachten, dass Leptin bei Nagern je nach Fettkompartiment unterschiedlich exprimiert werden kann und zudem einer pulsatilen Sekretion mit zirkadianer Rhythmik unterliegt, was jeweils zu einer Verzerrung der Korrelation des Serumleptinspiegels mit dem Körperfettanteil führen kann (Sinha et al. 1996; Licinio et al. 1997; Margetic et al. 2002).

4. GH und IGF-I

Trotz der z. B. an der Körpergewichtsentwicklung erwiesenen Wirksamkeit des verabreichten GH-Präparats konnte laborchemisch keine Erhöhung der GH-Serumkonzentrationen durch die Injektionen von GH nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist plausibel, denn einerseits bindet der Anti-GH-Antikörper des verwendeten Assays Ratten- bzw. Maus-GH spezifisch und erkennt daher das verabreichte humane

Wachstumshormon nicht. Andererseits ist natürlich zu beachten, dass einzelne, spontane, GH-Werte auf Grund der zirkadianen Rhythmik der GH-Sekretion nur sehr begrenzt aussagefähig sind (Wajnrajch 2005). Es ist anzunehmen, dass durch die GH-Gabe die körpereigene Sekretion von GH inhibiert wird und so bei den mit GH behandelten Tieren am ehesten niedrigere körpereigene GH-Spiegel vorliegen müssten. Die zur genaueren Analyse nötigen GH-Profile wurden hier jedoch nicht durchgeführt, da der therapeutische Effekt der GH-Gabe den eigentlichen Gegenstand dieser Arbeit darstellt.

Auch die Serumkonzentrationen von IGF-I ließen sich durch die GH-Injektionen kaum beeinflussen. Unter einer Ernährung mit Chow gelang sowohl in Studie 1 als auch in Studie 3 im Vergleich zu den mit Kontrollsubstanz behandelten Tieren eine geringfügige, statistisch nicht signifikante Erhöhung der mittleren IGF-I-Spiegel durch die Gabe von GH. Auch unter einer Ernährung mit LCHFD gelang keine Erhöhung der erniedrigten IGF-I Spiegel durch die Gabe von GH. Mit der hier durch die Gabe von GH erreichten unwesentlichen, statistisch nicht signifikanten Erhöhung der mittleren IGF-I-Konzentrationen blieben diese unter dem Niveau der Referenzgruppe.

Die in den Studien 2 und 3 festgestellte Erniedrigung der Serumkonzentrationen von IGF-I unter LCHFD bei Ratten wurde von uns bereits mehrfach beobachtet (Caton et al. 2009; Caton et al. 2012). Durch die exzessive Zufuhr von Fett über die Nahrung bei LCHFD steigt die Konzentration freier Fettsäuren im Serum, wodurch die Sekretion des lipolytisch wirksamen Wachstumshormons gehemmt wird und der Hauptstimulus für die Produktion von IGF-I entfällt (Hesch et al. 1994). In Folge hemmt die so beförderte Erhöhung des Körperfettanteils, wobei der Vermehrung von viszeralem Fett eine zentrale Bedeutung zuzukommen scheint, die Ausschüttung von GH weiter (Veldhuis et al. 1995; Clasey et al. 2001). Einerseits ist diese Regulation durch eine Verminderung des GH-Sekretagogums Ghrelin vermittelt, andererseits scheint Leptin eine direkte IGF-I-senkende Wirkung zu haben (Tschop et al. 2001; Martin et al. 2007).

Gemäß der bekannten biologischen Wirkung von humanem GH bei Menschen wäre auch im Nagermodell – entgegen den Ergebnissen der hier vorgestellten Studien – eine IGF-I-Erhöhung nach einer Verbreichung von humanem GH zu erwarten gewesen (Knobil und Greep 1959; Schweikert 2001). In der Literatur findet sich in vergleichbaren Tiermodellen jedoch meist nur dann ein Anstieg der IGF-I-Konzentration bei Ratten, wenn GH in noch höheren Dosen verabreicht wurde (Matejka und Bengtsson 1998; Johansen et al. 2005; An und Xiao 2007). Entsprechend ist anzunehmen, dass sich der fehlende Effekt der GH-Gabe auf die Konzentration von IGF-I in den hier vorgestellten Studien einerseits durch die

vergleichsweise geringe Dosis erklärt, andererseits IGF-I bei gesunden Nagern generell kein guter pharmakodynamischer Marker zu sein scheint. In der Tat lassen Arbeiten an hypophysektomierten und scheinoperierten Ratten vermuten, dass ein Anheben der IGF-I-Spiegel nur bei GH-defizienten Tieren, sprich bei solchen mit a priori erniedrigten IGF-I-Spiegeln, nicht aber bei Tieren mit normalem Hormonhaushalt, möglich ist (Domene et al. 1993).

5. Kalorimetrie

Der in Studie 3 ermittelte RQ hat sich in den mit LCHFD gefütterten Gruppen unabhängig von der Licht- bzw. Dunkelphase signifikant verringert, während er in den mit Chow gefütterten Gruppen beinahe unverändert blieb. Auf Grund der nahezu ausschließlich aus Fett bestehenden LCHFD (vgl. Tab. 2-2) wäre sogar ein noch niedriger Wert des RQ zu erwarten (Jeukendrup und Wallis 2005). Jedoch kann die verwendete Methode der indirekten Kalorimetrie in gewissen Stoffwechsellagen, so auch in der Ketose, RQs ergeben, die die tatsächlichen Verhältnisse der oxidierten Substrate auch bei relativ langen Messperioden verzerrt wiedergeben (Schutz 1997). Darüberhinaus kann trotz regelmäßiger Eichung der Sensoren nicht von einer absoluten Messgenauigkeit des Systems ausgegangen werden. Ebenso ist durch die Errechnung des RQ ohne tatsächliche Messung der Stickstoffausscheidung eine mögliche Fehlerquelle gegeben. Insgesamt jedoch ist unter der Fütterung mit LCHFD ein gegenüber Chow deutlich erniedrigter RQ gegeben, was sehr plausibel ist.

Die Veränderungen des Energieumsatzes während der Studie unterschieden sich zwischen den Gruppen in der Lichtphase nicht signifikant, in der Dunkelphase aber schon. Der im Vergleich zu der mit Chow gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe signifikant verringerte Energieumsatz der mit LCHFD gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe ist passend zur Körperzusammensetzung, denn der gemessene erhöhte Körperfettanteil sowie die erhöhten Leptinwerte dieser Gruppe sind als Hinweise auf eine reduzierte fettfreie Körpermasse zu werten, welche die Hauptbestimmungsgröße des Energieumsatzes darstellt (Webb 1981). Auch in Vorgängerstudien haben wir bereits mehrfach einen erhöhten Körperfettanteil und eine Verringerung des Energieumsatzes bei Ratten, die mit einer LCHFD ernährt wurden, beobachtet, wobei andere Autoren von einer Erhöhung des Energieumsatzes bei Nagern unter vergleichbaren Diäten berichteten (Kennedy et al. 2007; Caton et al. 2009; Bielohuby et al. 2011). Ein möglicher Mechanismus für die beobachtete Verringerung des

Energieumsatzes ist die Erniedrigung des Aktivitätsniveaus unter einer solchen Ernährungsform (Bandini et al. 1994; Murphy et al. 2005; Murphy und Burnham 2006). Da in dieser Studie keine Messung der lokomotorischen Aktivität vorgenommen wurde, kann man über den Einfluss des Aktivitätsniveaus nur spekulieren. Zwar spricht die Tatsache, dass signifikante Unterschiede zwischen den Veränderungen des Energieumsatzes der Gruppen ausschließlich während der Dunkelphase nachweisbar waren, aufgrund der zirkadianen Rhythmik des Aktivitätsniveaus bei Ratten für einen Einfluss der lokomotorischen Aktivität. Doch im Gegensatz zu allen anderen Gruppen nahm der Energieumsatz dieser Gruppe auch in der Lichtphase zu, wenngleich die Unterschiede der Veränderung des Energieumsatzes in dieser Periode keine statistische Signifikanz erreichten. Die in anderen Studien erhobenen Daten bezüglich des Effekts einer Gabe von GH bzw. einer erhöhten intrinsischen GH-Produktion auf das Aktivitätsniveau bei Nagern sind widersprüchlich. Während manche Autoren von einer Erhöhung der spontanen lokomotorischen Aktivität berichten, beschreiben andere ein verringertes Aktivitätsniveau bei erhöhten GH-Spiegeln, weshalb von einer untergeordneten Rolle des Aktivitätsniveaus bei der Veränderung des Energieumsatzes unter der Gabe von GH bei Nagern auszugehen ist (Alvarez und Cacabelos 1993; Soderpalm et al. 1999; Bielohuby et al. 2011). Die Messungen der Fettdepots sowie der Leptinspiegel in der mit LCHFD gefütterten und mit GH behandelten Gruppe – in der sich der Energieumsatz im Lauf des Experiments nicht nur auf das Maß der mit Chow gefütterten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe erhöht hat, sondern den höchsten Energieumsatz aller Gruppen aufwies – lassen auf einen anderen Grund für die Erhöhung des Energieumsatzes schließen. So ließ sich der Anteil des Körperfetts in dieser mit LCHFD ernährten Gruppe durch die Gabe von GH auf das Niveau der Kontrollgruppe senken; sowohl das chirurgische Verfahren zur Bestimmung der Fettanteile als auch die Bestimmung der Leptinspiegel erbrachten einen signifikanten Unterschied zu der mit LCHFD ernährten und mit Kontrollsubstanz behandelten Gruppe. Es ist somit wahrscheinlich, dass die signifikante Erhöhung des Energieumsatzes in der mit LCHFD ernährten und mit GH behandelten Gruppe Ausdruck der lipolytischen Wirkung des verabreichten GH ist.

6. Schlussfolgerungen

Die erhobenen Daten zeigen eine teilweise Kompensation der Wirkungen einer LCHFD auf die somatotrope Achse durch die Gabe von GH im Nagermodell. Während das Anheben der IGF-I-Spiegel und die Stimulation der Körpergewichtsentwicklung durch GH-Gabe unter einer LCHFD nicht möglich waren, konnte der Körperfettanteil durch die Injektionen gesenkt werden. Mit Bezug auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen von GH ließ sich also mit der Lipolyse nur ein direkter Effekt des GH beobachten, während die indirekten, IGF-I-vermittelten Wirkungen von GH ausblieben – die Signalkaskade der Somatomedine zur Vermittlung der GH-Wirkung scheint unter einer Fütterung von LCHFD beeinträchtigt. In früheren Studien wurde bereits beschrieben, dass Nager im Hungerzustand eine Verringerung der hepatischen Bindungsstellen für GH aufweisen, welche die beobachteten erniedrigten IGF-I-Konzentrationen erklären könnten (Baxter et al. 1981; Postel-Vinay et al. 1982). Es ist anzunehmen, dass die diesem Phänomen unter Nahrungskarenz zu Grunde liegenden Mechanismen auch unter einer ketotischen Stoffwechsellage wirken. So konnten wir in nachfolgenden und teilweise veröffentlichten Arbeiten zeigen, dass der hepatische Wachstumshormonrezeptor bei Fütterung mit LCHFD einer Down-Regulation unterliegt (Bielohuby et al. 2011). Diese hepatische GH-Resistenz wäre für sich eine Erklärung für die erniedrigten Serum-IGF-I-Spiegel, da die Leber den Hauptsynthesort von IGF-I darstellt.

Etabliert ist damit ein Modell, an dem direkte GH- und indirekte IGF-I- vermittelte Effekte nutritiv unterschiedlich beeinflusst werden – während unter Fütterung einer LCHFD indirekte, also IGF-I-vermittelte Wirkungen einer GH-Gabe ausbleiben, können direkte GH-Effekte erzielt werden. Die beschriebene Antagonisierung der Zunahme des Körperfettanteils unter einer Fütterung mit LCHFD durch die Gabe von GH deutet darauf hin, dass die vergrößerten Fettdepots bei Tieren, die mit einer solchen Diät gefüttert werden, zumindest teilweise durch eine Erniedrigung der GH-Sekretion bedingt sind.

Trotz dieser im Tiermodell gezeigten prinzipiellen Umkehrbarkeit der Vermehrung des Körperfettanteils ist aufgrund der beschriebenen, durch GH-Gabe nicht reversiblen Wirkungen einer LCHFD, wie Retardierung der Körpergewichtsentwicklung, eine solche Diätform beim Menschen nur nach strenger Indikationsstellung anzuwenden. So sollte zum Beispiel eine LCHFD als diätetische Therapie einer Epilepsie bei Kindern durch die nicht durch GH-Gabe beeinflussbare Wachstumsverzögerung äußerst kritisch hinterfragt werden. Ebenso müssen unerwünschte Wirkungen einer GH-Supplementation, wie die Erhöhung der Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Malignomen, bei der

Entscheidung für oder gegen eine solche Therapie in Erwägung gezogen werden (Laron 2011).

Darüber hinaus ist zu erwarten, dass andere, im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erfasste, IGF-I-vermittelte physiologische Effekte unter einer LCHFD ebenfalls einer Supprimierung unterliegen. In einer anderen Studie konnten wir z. B. bei Nagern bereits zeigen, dass unter der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Diät eine Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels mit einer Verminderung des Längenwachstums sowie der Knochendichte auftritt (Bielohuby et al. 2009). Zur endgültigen Beurteilung solcher Ernährungsformen, sei es zur Therapie der Adipositas oder von Anfallsleiden bei Kindern, bedarf es weiterer Studien, die die Wirkungen von LCHFD bei Menschen untersuchen.

V Zusammenfassung

Um der weltweit zunehmenden Prävalenz der Adipositas und ihrer Komorbiditäten gegenzusteuern, werden verschiedene Interventionen diskutiert. Zu den beliebtesten Ernährungsformen, die zu Gewichtsverlust führen, zählen die sog. low-carbohydrate high-fat diets (LCHFD). Die Wirkmechanismen dieser Diät sind trotz beschriebener Wirksamkeit sowohl hinsichtlich einer Reduktion des Körpergewichts bei Erwachsenen, als auch zur Therapie bestimmter Epilepsieformen bei Kindern, bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Ausgehend von Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe, dass unter LCHFD eine Suppression der somatotropen Achse erfolgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die pharmakologische Umkehrbarkeit dieses Zusammenhangs im Rahmen von drei Studien an einem Rattenmodell (Wistar, männlich) untersucht.

In einer ersten Pilotstudie (Studie 1) wurden subkutane Injektionen verschiedener Dosen Wachstumshormon (GH; 0,06 mg/d und 0,6 mg/d) an Ratten, die normale Nagerkost (Chow; 58 % Kohlenhydrate, 9 % Fett; 33 % Protein) erhielten, verabreicht. Ratten, die entweder mit einer LCHFD (1,3 % Kohlenhydrate, 94 % Fett, 4,2 % Protein) oder Chow gefüttert wurden, erhielten in einer zweiten Pilotstudie (Studie 2) verschiedene Dosen GH (0,06 mg/d und 0,6 mg/d). In diesen jeweils 10-tägigen Pilotstudien wurde die Wirkung der GH-Gaben auf die Entwicklung des Körpergewichts, den durch Extraktion von Fettdepots chirurgisch bestimmten Körperfettanteil sowie die Serumkonzentrationen von Leptin und IGF-I an jeweils zwölf Tieren untersucht. Im Hauptexperiment (Studie 3) wurden 32 Tiere (in 4 Gruppen à 8 Tiere) für 16 Tage entweder mit Chow oder mit LCHFD gefüttert, sowie entweder mit GH (ca. 0,9 mg/d) oder Injektionen einer Kontrollsubstanz (Aqua ad iniectabilia) behandelt. Untersucht wurde, ob sich die bekannten Effekte einer LCHFD auf die Entwicklung des Körpergewichts, den chirurgisch bestimmten Körperfettanteil, sowie die Serumkonzentrationen von Leptin, insulin-like growth factor I (IGF-I) und GH durch die hochdosierte subkutane Gabe von GH aufheben lassen. Des Weiteren wurden im Hauptexperiment mittels indirekter Kalorimetrie vor Beginn und vor Beendigung der Studie der respiratorische Quotient (RQ) sowie der Energieumsatz bestimmt.

Es zeigte sich, dass eine unter Fütterung mit LCHFD auftretende Retardierung der Körpergewichtsentwicklung durch die Gabe von GH nicht kompensiert werden kann. Ebenso konnten die durch eine LCHFD erniedrigten Serumkonzentrationen von IGF-I durch Gabe von GH nicht angehoben werden. Jedoch konnte die Erhöhung des Körperfettanteils als Effekt einer LCHFD durch die Gabe von GH antagonisiert werden.

Der RQ nahm bei einer LCHFD unabhängig von einer GH-Gabe ab, und zwar sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase. Der Energieumsatz während der Dunkelphase konnte unter Fütterung einer LCHFD durch die Gabe von GH gesteigert werden.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der vorgestellten Studien, also durch die Gabe von GH unter Fütterung einer LCHFD, direkte GH-Effekte erzielt werden, während indirekte, d. h. IGF-I-vermittelte Wirkungen ausblieben. Die erfolgreiche Kompensation der Zunahme der Körperfettanteils bei Fütterung einer LCHFD durch die Gabe von GH deutet darauf hin, dass Teil der Erklärung des vergrößerten Fettanteils bei LCHFD-gefütterten Tieren eine erniedrigte Sekretion von GH ist.

Die gezeigte Suppression der somatotropen Achse unter LCHFD, welche durch die Gabe von GH partiell kompensiert werden kann, ist mit potentiell schwerwiegenden Folgen behaftet. Es bedarf daher weiterer Studien an Menschen, um die Konsequenzen einer solchen Diät zur Reduktion des Körpergewichts und als Therapie kindlicher Anfallsleiden besser abschätzen zu können.

VI Literaturverzeichnis

- Adam-Perrot, A., P. Clifton, et al. (2006). "Low-carbohydrate diets: nutritional and physiological aspects." *Obes Rev* 7(1): 49-58.
- Alvarez, X. A. and R. Cacabelos (1993). "Influence of growth hormone (GH) and GH-releasing factor on locomotor activity in rats." *Peptides* 14(4): 707-712.
- An, Y. and Y. B. Xiao (2007). "The preventative role of growth hormone on acute liver injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model." *Eur J Cardiothorac Surg* 31(6): 1037-1043.
- Astrup, A., T. Meinert Larsen, et al. (2004). "Atkins and other low-carbohydrate diets: hoax or an effective tool for weight loss?" *Lancet* 364(9437): 897-899.
- Atkins, R. C., MD (1972). "Dr. Atkins' Diet Revolution: the High Calorie Way to Stay Thin Forever." Bantam Books.
- Bandini, L. G., D. A. Schoeller, et al. (1994). "Metabolic differences in response to a high-fat vs. a high-carbohydrate diet." *Obes Res* 2(4): 348-354.
- Bantle, J. P., J. Wylie-Rosett, et al. (2008). "Nutrition recommendations and interventions for diabetes: a position statement of the American Diabetes Association." *Diabetes Care* 31 Suppl 1: S61-78.
- Baranano, K. W. and A. L. Hartman (2008). "The ketogenic diet: uses in epilepsy and other neurologic illnesses." *Curr Treat Options Neurol* 10(6): 410-419.
- Baxter, R. C., J. M. Bryson, et al. (1981). "The effect of fasting on liver receptors for prolactin and growth hormone." *Metabolism* 30(11): 1086-1090.
- Bergqvist, A. G., J. I. Schall, et al. (2008). "Progressive bone mineral content loss in children with intractable epilepsy treated with the ketogenic diet." *Am J Clin Nutr* 88(6): 1678-1684.
- Berneis, K. and U. Keller (1996). "Metabolic actions of growth hormone: direct and indirect." *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 10(3): 337-352.
- Berrington de Gonzalez, A., P. Hartge, et al. (2010). "Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults." *N Engl J Med* 363(23): 2211-2219.
- BGBI, B. (2001). "Gesetz über die Beseitigung von Tierkörpern, Tierkörperteilen und tierischen Erzeugnissen (Tierkörperbeseitigungsgesetz)." *Bundesgesetzblatt Teil I* (Nr. 16): S. 524ff.
- Bielohuby, M., M. Matsuura, et al. (2009). "Short Term Exposure to Low-Carbohydrate / High Fat Diets Induces Low Bone Mineral Density and Reduces Bone Formation in Rats." *J Bone Miner Res*.
- Bielohuby, M., D. Menhofer, et al. (2011). "Induction of ketosis in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets depends on the relative abundance of dietary fat and protein." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(1): E65-76.
- Bielohuby, M., M. Sawitzky, et al. (2011). "Lack of dietary carbohydrates induces hepatic growth hormone (GH) resistance in rats." *Endocrinology* 152(5): 1948-1960.

- Boden, G., X. Chen, et al. (1994). "Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake." *J Clin Invest* 93(6): 2438-2446.
- Brawer, R., N. Brisbon, et al. (2009). "Obesity and cancer." *Prim Care* 36(3): 509-531.
- Brehm, B. J., R. J. Seeley, et al. (2003). "A randomized trial comparing a very low carbohydrate diet and a calorie-restricted low fat diet on body weight and cardiovascular risk factors in healthy women." *J Clin Endocrinol Metab* 88(4): 1617-1623.
- Brown, W. V., K. Fujioka, et al. (2009). "Obesity: why be concerned?" *Am J Med* 122(4 Suppl 1): S4-11.
- Cappon, J. P., E. Ipp, et al. (1993). "Acute effects of high fat and high glucose meals on the growth hormone response to exercise." *J Clin Endocrinol Metab* 76(6): 1418-1422.
- Carrel, A. L. and D. B. Allen (2000). "Effects of growth hormone on adipose tissue." *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 2: 1003-1009.
- Caton, S. J., M. Bielohuby, et al. (2012). "Low-carbohydrate high-fat diets in combination with daily exercise in rats: Effects on body weight regulation, body composition and exercise capacity." *Physiol Behav* 106(2): 185-192.
- Caton, S. J., B. Yinglong, et al. (2009). "Low-carbohydrate high-fat diets: regulation of energy balance and body weight regain in rats." *Obesity (Silver Spring)* 17(2): 283-289.
- Chao, A., M. J. Thun, et al. (2005). "Meat consumption and risk of colorectal cancer." *JAMA* 293(2): 172-182.
- Chrisoulidou, A., S. A. Beshyah, et al. (2000). "Effects of 7 years of growth hormone replacement therapy in hypopituitary adults." *J Clin Endocrinol Metab* 85(10): 3762-3769.
- Clasey, J. L., A. Weltman, et al. (2001). "Abdominal visceral fat and fasting insulin are important predictors of 24-hour GH release independent of age, gender, and other physiological factors." *J Clin Endocrinol Metab* 86(8): 3845-3852.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." *N Engl J Med* 334(5): 292-295.
- Cummings, D. E. and G. R. Merriam (2003). "Growth hormone therapy in adults." *Annu Rev Med* 54: 513-533.
- Damjanovic, M. and M. Barton (2008). "Fat intake and cardiovascular response." *Curr Hypertens Rep* 10(1): 25-31.
- Daughaday, W. H., K. Hall, et al. (1972). "Somatomedin: proposed designation for sulphation factor." *Nature* 235(5333): 107.
- Deitel, M. (2002). "The International Obesity Task Force and "globesity"." *Obes Surg* 12(5): 613-614.
- Domene, H., K. Krishnamurthi, et al. (1993). "Growth hormone (GH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I-binding protein-3, but not GH receptor gene expression in livers of juvenile rats." *Endocrinology* 133(2): 675-682.

- Fineberg, S. E. and T. J. Merimee (1974). "Acute metabolic effects of human growth hormone." *Diabetes* 23(6): 499-504.
- Finkelstein, E. A., C. J. Ruhm, et al. (2005). "Economic causes and consequences of obesity." *Annu Rev Public Health* 26: 239-257.
- Flegal, K. M., M. D. Carroll, et al. (2010). "Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008." *JAMA* 303(3): 235-241.
- Foo, S. Y., E. R. Heller, et al. (2009). "Vascular effects of a low-carbohydrate high-protein diet." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(36): 15418-15423.
- Foster, G. D., H. R. Wyatt, et al. (2003). "A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity." *N Engl J Med* 348(21): 2082-2090.
- Freda, P. U., W. Shen, et al. (2008). "Lower visceral and subcutaneous but higher intermuscular adipose tissue depots in patients with growth hormone and insulin-like growth factor I excess due to acromegaly." *J Clin Endocrinol Metab* 93(6): 2334-2343.
- Friedman, J. M. and J. L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-770.
- Fryburg, D. A., R. J. Louard, et al. (1992). "Growth hormone stimulates skeletal muscle protein synthesis and antagonizes insulin's antiproteolytic action in humans." *Diabetes* 41(4): 424-429.
- Gardner, C. D., A. Kiazand, et al. (2007). "Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial." *JAMA* 297(9): 969-977.
- Ghoshal, U. C. (2007). "Review of pathogenesis and management of constipation." *Trop Gastroenterol* 28(3): 91-95.
- Goldenberg, N. and A. Barkan (2007). "Factors regulating growth hormone secretion in humans." *Endocrinol Metab Clin North Am* 36(1): 37-55.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2003). "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay." *Immunology*, 5th ed. (W. H. Freeman Palgrave Macmillan): pp.148-150.
- Groesbeck, D. K., R. M. Bluml, et al. (2006). "Long-term use of the ketogenic diet in the treatment of epilepsy." *Dev Med Child Neurol* 48(12): 978-981.
- Grote, J. (2000). "Gewebeatmung." *Physiologie des Menschen*, 28. Auflage R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.) (Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag): S. 624 ff.
- Guh, D. P., W. Zhang, et al. (2009). "The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis." *BMC Public Health* 9: 88.
- Hahn, T. J., L. R. Halstead, et al. (1979). "Disordered mineral metabolism produced by ketogenic diet therapy." *Calcif Tissue Int* 28(1): 17-22.
- Haslam, D. W. and W. P. James (2005). "Obesity." *Lancet* 366(9492): 1197-1209.

- Hesch, R., H. Becker, et al. (1994). "Erkrankungen des Hypothalamus-Hypophysen-Systems." Die innere Medizin Gross R, Schölmerich P, Gerok W (Stuttgart, New York; Schattauer, F. K.;): S. 872-845.
- Huffman, J. and E. H. Kossoff (2006). "State of the ketogenic diet(s) in epilepsy." *Curr Neurol Neurosci Rep* 6(4): 332-340.
- James, W. P. (2008). "The epidemiology of obesity: the size of the problem." *J Intern Med* 263(4): 336-352.
- Jeukendrup, A. E. and G. A. Wallis (2005). "Measurement of substrate oxidation during exercise by means of gas exchange measurements." *Int J Sports Med* 26 Suppl 1: S28-37.
- Johansen, T., C. Laurino, et al. (2005). "Reduction of adiposity with prolonged growth hormone treatment in old obese rats: effects on glucose handling and early insulin signaling." *Growth Horm IGF Res* 15(1): 55-63.
- Joost, H.-G. (2003). "Stellungnahme des DIfE zu Gewichtsreduktions-Diäten mit hohem Fett- und Proteinanteil (z.B. sog. Atkins-Diät)."
<http://www.dife.de/de/presse/stellungnahmen/Stellungnahme%20des%20DIfE%20zu%20Gewichtsreduktions.pdf> (Homepage des Deutsches Institutes für Ernährungsforschung (DIfE)), abgerufen am 20.01.2010.
- Kaufman, W. (2005). "Atkins Bankruptcy a Boon for Pasta Makers."
<http://www.npr.org/templates/story/story.php?storyId=4783324> abgerufen am 20.01.2010.
- Kelly, P. A., J. Finidori, et al. (2001). "Growth hormone receptor signalling and actions in bone growth." *Horm Res* 55 Suppl 2: 14-17.
- Kennedy, A. R., P. Pissios, et al. (2007). "A high-fat, ketogenic diet induces a unique metabolic state in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(6): E1724-1739.
- Kinzig, K. P. and R. J. Taylor (2009). "Maintenance on a ketogenic diet: voluntary exercise, adiposity and neuroendocrine effects." *Int J Obes (Lond)* 33(8): 824-830.
- Knobil, E. and R. Greep (1959). "The physiology of growth hormone with specific reference to its action in Rhesus monkey and the 'species specificity problem'." *Rec. Progr. Hormon. Res.*(15): 1-25.
- Kojima, M., H. Hosoda, et al. (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 402(6762): 656-660.
- Kostyo, J. L. and C. R. Reagan (1976). "The biology of growth hormone." *Pharmacol Ther* B 2(3): 591-604.
- Laron, Z. (2011). "Growth hormone therapy: emerging dilemmas." *Pediatr Endocrinol Rev* 8(4): 364-373.
- Last, A. R. and S. A. Wilson (2006). "Low-carbohydrate diets." *Am Fam Physician* 73(11): 1942-1948.
- Le Roith, D., L. Scavo, et al. (2001). "What is the role of circulating IGF-I?" *Trends Endocrinol Metab* 12(2): 48-52.

- Licinio, J., C. Mantzoros, et al. (1997). "Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function." *Nat Med* 3(5): 575-579.
- Mantzoros, C. S., F. Magkos, et al. (2011). "Leptin in human physiology and pathophysiology." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(4): E567-584.
- Margetic, S., C. Gazzola, et al. (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions." *Int J Obes Relat Metab Disord* 26(11): 1407-1433.
- Mark, A. L., M. L. Correia, et al. (2002). "Selective leptin resistance: a new concept in leptin physiology with cardiovascular implications." *J Hypertens* 20(7): 1245-1250.
- Martin, A., V. David, et al. (2007). "Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway." *Endocrinology* 148(7): 3419-3425.
- Matejka, G. L. and B. A. Bengtsson (1998). "High dosage growth hormone treatment and Post-ischemic acute renal failure in the rat." *Growth Horm IGF Res* 8(2): 151-157.
- Mauras, N. (2009). "Strategies for maximizing growth in puberty in children with short stature." *Endocrinol Metab Clin North Am* 38(3): 613-624.
- Mauras, N. and M. W. Haymond (2005). "Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable?" *Growth Horm IGF Res* 15(1): 19-27.
- Max-Rubner-Institut (2008). "Nationale Verzehrsstudie II Ergebnisbericht, Teil 1." http://www.was-esse-ich.de/uploads/media/NVS_II_Abschlussbericht_Teil_1.pdf abgerufen am 20.01.2010.
- Meckling, K. A., C. O'Sullivan, et al. (2004). "Comparison of a low-fat diet to a low-carbohydrate diet on weight loss, body composition, and risk factors for diabetes and cardiovascular disease in free-living, overweight men and women." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2717-2723.
- Murphy, P. and W. M. Burnham (2006). "The ketogenic diet causes a reversible decrease in activity level in Long-Evans rats." *Exp Neurol* 201(1): 84-89.
- Murphy, P., S. S. Likhodii, et al. (2005). "Effect of the ketogenic diet on the activity level of Wistar rats." *Pediatr Res* 57(3): 353-357.
- Myers, M. G., M. A. Cowley, et al. (2008). "Mechanisms of leptin action and leptin resistance." *Annu Rev Physiol* 70: 537-556.
- Nam, S. Y., K. R. Kim, et al. (2001). "Low-dose growth hormone treatment combined with diet restriction decreases insulin resistance by reducing visceral fat and increasing muscle mass in obese type 2 diabetic patients." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25(8): 1101-1107.
- National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute in cooperation with the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (1998). "Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health." *Obes Res* 6 Suppl 2: 51S-209S.

- National Library of Medicine, National Institutes of Health (2010). "Anzahl der mit dem Begriff "Obesity" verschlagworteten Arbeiten in der Meta-Datenbank der U. S. National Library of Medicine (NLM) der National Institutes of Health: 130649." <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>, Stand 09.03.2010.
- Nguyen, D. M. and H. B. El-Serag (2010). "The epidemiology of obesity." *Gastroenterol Clin North Am* 39(1): 1-7.
- Noack, R. (1999). "Energiehaushalt." *Ernährungsmedizin* Hans Konrad Biesalski u. a. (Hrsg.)(Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York): S. 28 ff.
- NRC (1995). "Nutritional Requirements of Laboratory Animals." 4th ed.(National Academy of Sciences, Washington).
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1999). "OECD-Grundsätze der Guten Laborpraxis." OECD Veröffentlichungen zur Umweltsicherheit und -hygiene (EHS) Environment Directorate, Chemicals Group and Managment Committee(ENV/MC/CHEM(98)17): <http://www.bfr.bund.de/cm/252/oecdgs297.pdf>.
- Olshansky, S. J., D. J. Passaro, et al. (2005). "A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century." *N Engl J Med* 352(11): 1138-1145.
- Ostlund, R. E., Jr., J. W. Yang, et al. (1996). "Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates." *J Clin Endocrinol Metab* 81(11): 3909-3913.
- Papathanassoglou, E., K. El-Haschimi, et al. (2006). "Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice." *J Immunol* 176(12): 7745-7752.
- Pasarica, M., J. J. Zachwieja, et al. (2007). "Effect of growth hormone on body composition and visceral adiposity in middle-aged men with visceral obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 92(11): 4265-4270.
- Penman, E., J. A. Wass, et al. (1981). "Response of circulating immunoreactive somatostatin to nutritional stimuli in normal subjects." *Gastroenterology* 81(4): 692-699.
- Persson, P. B. (2008). "Energie- und Wärmehaushalt, Wärmeregulation." *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*. R. F. Schmidt, G. Thews und F. Lang (Hrsg.)(Springer, Berlin): S. 906 ff.
- Pi-Sunyer, X. (2009). "The medical risks of obesity." *Postgrad Med* 121(6): 21-33.
- Poirier, P., T. D. Giles, et al. (2006). "Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism." *Circulation* 113(6): 898-918.
- Postel-Vinay, M. C., E. Cohen-Tanugi, et al. (1982). "Growth hormone receptors in rat liver membranes: effects of fasting and refeeding, and correlation with plasma somatomedin activity." *Mol Cell Endocrinol* 28(3): 657-669.

- Quetelet, L.-A.-J. (1869). "Physique sociale: ou essay sur le développement des faculties de l'homme." Brussels: C. Muquardt.
- Sacks, F. M., G. A. Bray, et al. (2009). "Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates." *N Engl J Med* 360(9): 859-873.
- Salmon, W. D., Jr. and W. H. Daughaday (1957). "A hormonally Controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro." *J Lab Clin Med* 49(6): 825-836.
- Samaha, F. F., N. Iqbal, et al. (2003). "A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity." *N Engl J Med* 348(21): 2074-2081.
- Schutz, Y. (1997). "On problems of calculating energy expenditure and substrate utilization from respiratory exchange data." *Z Ernahrungswiss* 36(4): 255-262.
- Schweikert, H.-U. (2001). "Erkrankungen des Hypothalamus und der Hypophyse." *Duale Reihe Innere Medizin Reihenherausgeber Alexander und Konstantin Bob*(Georg Thieme Verlag Stuttgart): S. 748ff.
- Scott, J. R. (2009). "Atkins Q&A: Constipation on the Atkins Diet." <http://weightloss.about.com/od/theatkinsdiet/qt/blatconst.htm>, abgerufen am 20.01.2010.
- Scott, M. M., J. L. Lachey, et al. (2009). "Leptin targets in the mouse brain." *J Comp Neurol* 514(5): 518-532.
- Shai, I., D. Schwarzfuchs, et al. (2008). "Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet." *N Engl J Med* 359(3): 229-241.
- Sharman, M. J., A. L. Gomez, et al. (2004). "Very low-carbohydrate and low-fat diets affect fasting lipids and Postprandial lipemia differently in overweight men." *J Nutr* 134(4): 880-885.
- Sharman, M. J. and J. S. Volek (2004). "Weight loss leads to reductions in inflammatory biomarkers after a very-low-carbohydrate diet and a low-fat diet in overweight men." *Clin Sci (Lond)* 107(4): 365-369.
- Sierra-Honigmann, M. R., A. K. Nath, et al. (1998). "Biological action of leptin as an angiogenic factor." *Science* 281(5383): 1683-1686.
- Sinha, M. K., J. P. Ohannesian, et al. (1996). "Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects." *J Clin Invest* 97(5): 1344-1347.
- Soderpalm, B., M. Ericson, et al. (1999). "Bovine growth hormone transgenic mice display alterations in locomotor activity and brain monoamine neurochemistry." *Endocrinology* 140(12): 5619-5625.
- Sondike, S. B., N. Copperman, et al. (2003). "Effects of a low-carbohydrate diet on weight loss and cardiovascular risk factor in overweight adolescents." *J Pediatr* 142(3): 253-258.
- Takeda, S., F. Eleftheriou, et al. (2002). "Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system." *Cell* 111(3): 305-317.
- Tschop, M., C. Weyer, et al. (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." *Diabetes* 50(4): 707-709.

- Veldhuis, J. D., A. Y. Liem, et al. (1995). "Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay." *J Clin Endocrinol Metab* 80(11): 3209-3222.
- Vijayakumar, A., R. Novosyadlyy, et al. (2010). "Biological effects of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism." *Growth Horm IGF Res* 20(1): 1-7.
- Vining, E. P., P. Pyzik, et al. (2002). "Growth of children on the ketogenic diet." *Dev Med Child Neurol* 44(12): 796-802.
- Wajnrajch, M. P. (2005). "Physiological and pathological growth hormone secretion." *J Pediatr Endocrinol Metab* 18(4): 325-338.
- Wang, Y., M. A. Beydoun, et al. (2008). "Will all Americans become overweight or obese? estimating the progression and cost of the US obesity epidemic." *Obesity (Silver Spring)* 16(10): 2323-2330.
- Wang, Y. and T. Lobstein (2006). "Worldwide trends in childhood overweight and obesity." *Int J Pediatr Obes* 1(1): 11-25.
- Webb, P. (1981). "Energy expenditure and fat-free mass in men and women." *Am J Clin Nutr* 34(9): 1816-1826.
- Weir, J. B. (1949). "New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism." *J Physiol* 109(1-2): 1-9.
- Weiss, J., J. Meass, et al. (1996). "Haus- und Versuchstierpflege." W. Rossbach (Hrsg.)(Verlag Fischer, Stuttgart, Jena, New York): S. 58-64.
- Westman, E. C., W. S. Yancy, et al. (2002). "Effect of 6-month adherence to a very low carbohydrate diet program." *Am J Med* 113(1): 30-36.
- Westman, E. C., W. S. Yancy, Jr., et al. (2008). "The effect of a low-carbohydrate, ketogenic diet versus a low-glycemic index diet on glycemic Control in type 2 diabetes mellitus." *Nutr Metab (Lond)* 5: 36.
- White, A. M., C. S. Johnston, et al. (2007). "Blood ketones are directly related to fatigue and perceived effort during exercise in overweight adults adhering to low-carbohydrate diets for weight loss: a pilot study." *J Am Diet Assoc* 107(10): 1792-1796.
- WHO (1995). "Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee." *World Health Organ Tech Rep Ser* 854: 1-452.
- WHO (2006). "WHO Fact sheet No311: 'Obesity and Overweight'." <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> abgerufen am 20.01.2010.
- WHO/Europe (2006). "Europäische Ministerkonferenz der WHO zur Bekämpfung der Adipositas: 10x Wissenswertes über Adipositas." http://www.euro.who.int/Document/NUT/ObesityConf_10things_ger.pdf, abgerufen am 20.01.2010.
- Willett, W. C., W. H. Dietz, et al. (1999). "Guidelines for healthy weight." *N Engl J Med* 341(6): 427-434.

-
- Williams, K. W., M. M. Scott, et al. (2009). "From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus." *Am J Clin Nutr* 89(3): 985S-990S.
- Wolfram, G. (2010). "Aktuelle Meta-Analysen und systematische Übersichtsarbeiten bestätigen DGE-Leitlinie zum Fettkonsum."
http://www.dge.de/pdf/ws/100315_SFA_Statement.pdf: abgerufen am 02.04.2010
- World Health Organization (2000). "Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation." *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- Wylie-Rosett, J. and N. J. Davis (2009). "Low-carbohydrate diets: an update on current research." *Curr Diab Rep* 9(5): 396-404.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.

VII Abkürzungsverzeichnis

Aqua ad ini.	Aqua ad iniectabilia
BMI	Body Mass Index
CO₂	Kohlenstoffdioxid
EIA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GH	growth hormone
GHIH	growth hormone inhibiting hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone
HRP	horseradish peroxidase
IGF-I	insulin-like growth factor I
LCHFD	low-carbohydrate high-fat diet
n	Größe der Stichprobe
O₂	Sauerstoff
p	Signifikanzwert
RQ	respiratorischer Quotient
SD	standard deviation
TMB	Tetramethylbenzidin
WHO	World Health Organization

VIII Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Schematische Darstellung des GH-IGF-Regelkreises
Abbildung 2-1:	Schematischer Aufbau des Kalorimetriesystems
Abbildung 3-1:	Studie 1 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Abbildung 3-2:	Studie 1 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Abbildung 3-3:	Studie 1 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Abbildung 3-4:	Studie 1 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Abbildung 3-5:	Studie 2 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Abbildung 3-6:	Studie 2 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Abbildung 3-7:	Studie 2 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Abbildung 3-8:	Studie 2 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Abbildung 3-9:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Abbildung 3-10:	Studie 3 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Abbildung 3-11:	Studie 3 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Abbildung 3-12:	Studie 3 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Abbildung 3-13:	Studie 3 – GH-Konzentrationen im Serum
Abbildung 3-14:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des RQ in der Lichtphase
Abbildung 3-15:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des RQ in der Dunkelphase
Abbildung 3-16:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des Energieumsatzes in der Lichtphase
Abbildung 3-17:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des Energieumsatzes in der Dunkelphase
Abbildung A-1:	Fixation einer Ratte und Injektionsbehandlung
Abbildung A-2:	Projektion eines Zifferblatts auf ein Versuchstier
Abbildung A-3:	Laparatomie
Abbildung A-4:	Entnahme des epididymalen Fettdepots
Abbildung A-5:	Eröffnung des Retroperitoneums

Abbildung A-6: Entnahme des perirenaln Fettdepots

Abbildung A-7: Entnahme des inguinalen Fettdepots

IX Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Haltungsbedingungen der Tiere
Tabelle 2-2:	Zusammensetzung der verwendeten Diäten
Tabelle 2-3:	Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 1
Tabelle 2-4:	Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 2
Tabelle 2-5:	Kostform und Injektionen der Gruppen in Studie 3
Tabelle 3-1:	Studie 1 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Tabelle 3-2:	Studie 1 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Tabelle 3-3:	Studie 1 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Tabelle 3-4:	Studie 1 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Tabelle 3-5:	Studie 2 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Tabelle 3-6:	Studie 2 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Tabelle 3-7:	Studie 2 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Tabelle 3-8:	Studie 2 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Tabelle 3-9:	Studie 3 – Mittlere Veränderungen des Körpergewichts relativ zur Basalmessung
Tabelle 3-10:	Studie 3 – Mittlere Anteile der exstirpierten Fettgewebe am Körperendgewicht
Tabelle 3-11:	Studie 3 – Mittlere Serumleptinkonzentrationen
Tabelle 3-12:	Studie 3 – Mittlere IGF-I-Konzentrationen im Serum
Tabelle 3-13:	Studie 3 – Mittlere GH-Konzentrationen im Serum
Tabelle 3-14:	Studie 3 – RQ in der Lichtphase
Tabelle 3-15:	Studie 3 – RQ in der Dunkelphase
Tabelle 3-16:	Studie 3 – Energieumsatz in der Lichtphase
Tabelle 3-17:	Studie 3 – Energieumsatz in der Dunkelphase

X Anhang

1. Injektionstechnik



Abb. A-1: Fixierung einer Ratte und Injektionsbehandlung



Abb. A-2: Projektion eines Zifferblatts auf ein Versuchstier zur Festlegung der wechselnden Injektionsstellen

2. Laparatomie



Abb. A-3: Laparatomie entlang der Linea alba

3. Bestimmung des Körperfettanteils



Abb. A-4: Entnahme des rechten epididymalen Fettdepots (mit Pinzette gehalten).
* rechter Testikel

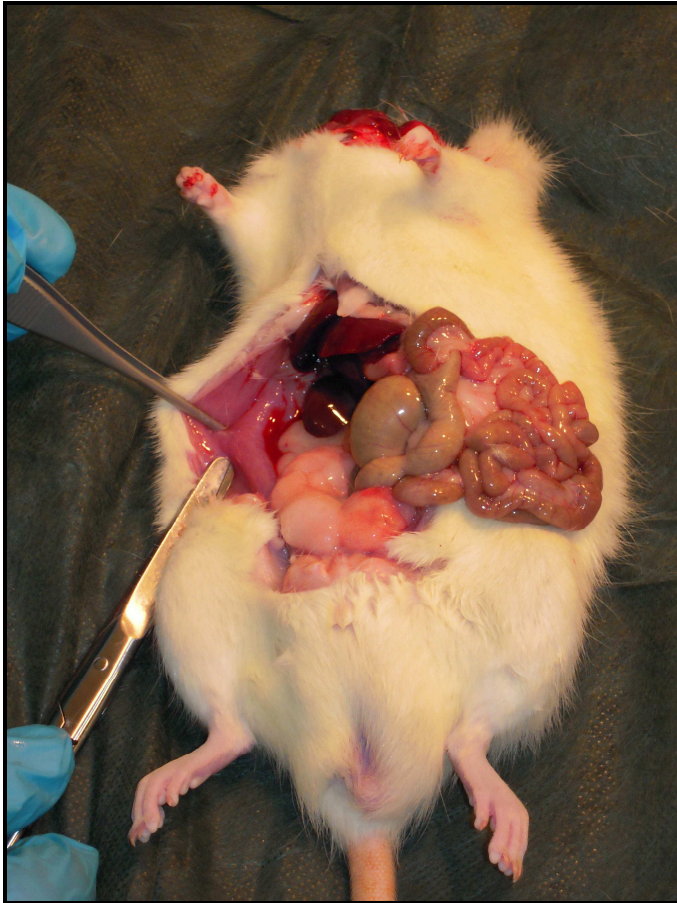


Abb. A-5: Eröffnung des Retroperitoneums

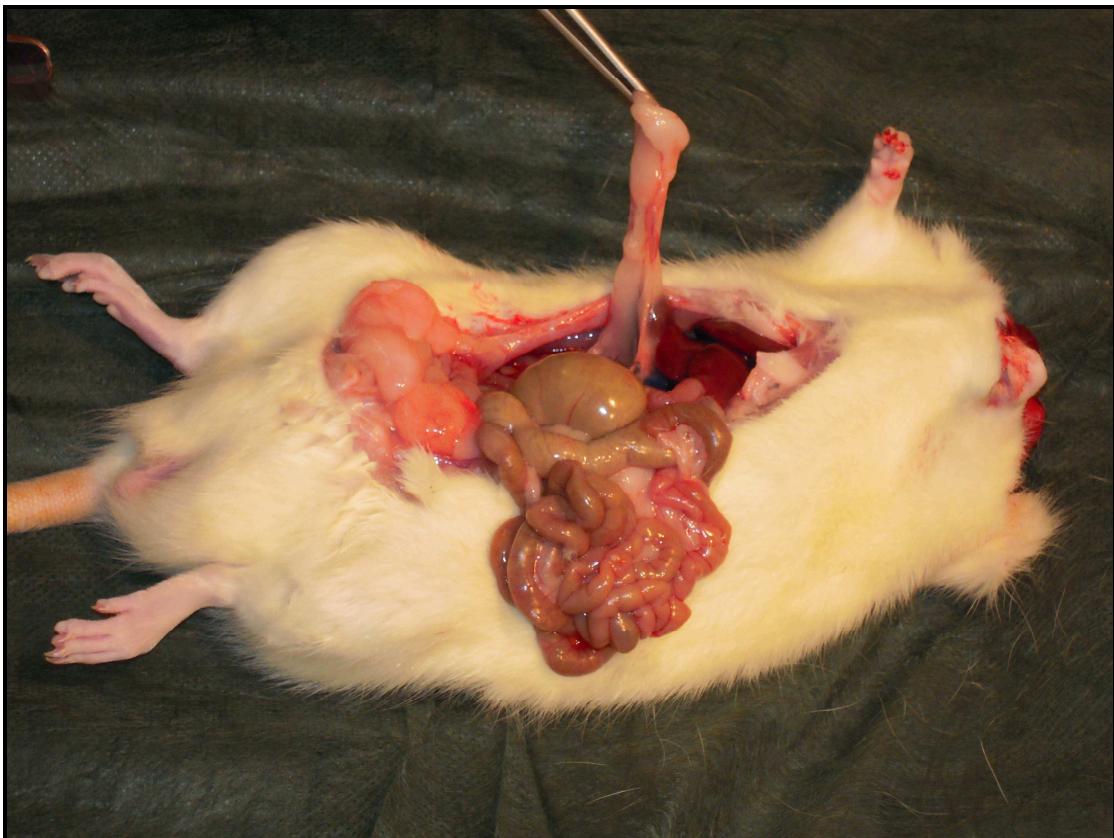


Abb. A-6: Entnahme des rechten perirenal Fettdepots (mit Pinzette gehalten)

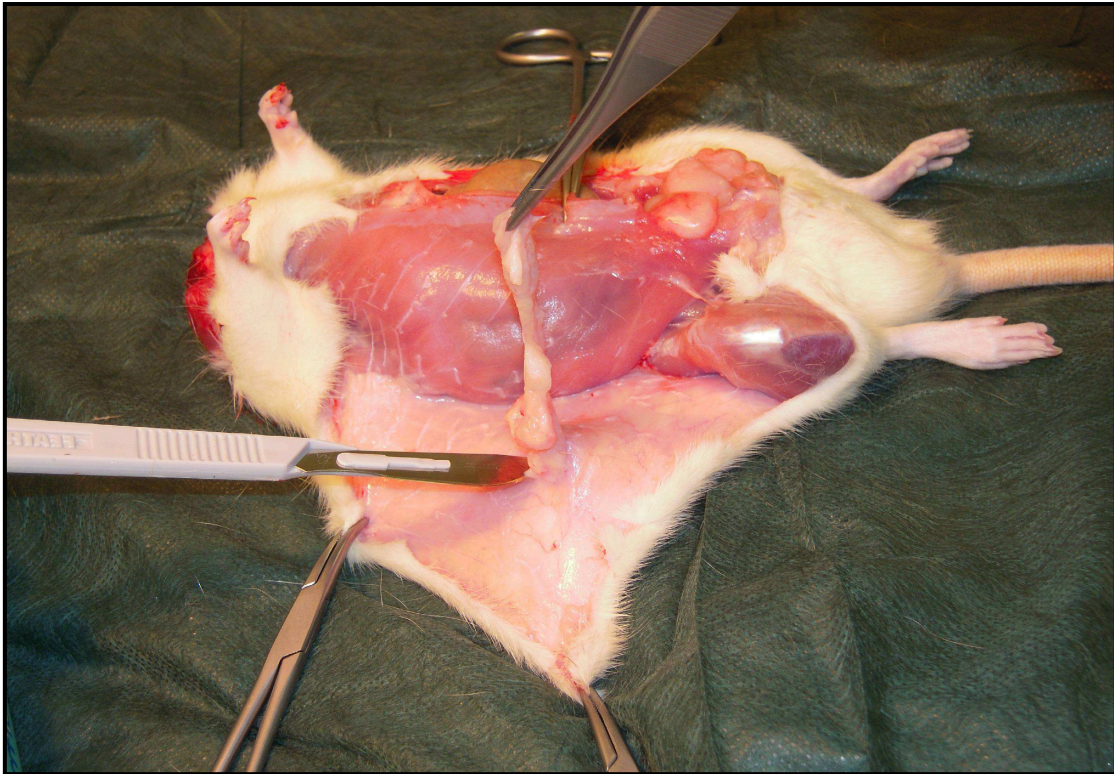


Abb. A-7: Entnahme des rechten inguinalen Fettdepots (mit Pinzette gehalten)

XI Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke, für die freundliche Überlassung des Themas.

Dem Betreuer meiner Doktorarbeit, Dr. med. Martin Bidlingmaier, gilt mein ganz besonderer Dank. Als Leiter der Arbeitsgruppe war er mir Mentor und Förderer, der meiner Promotion inmitten unzähliger weiterer Aufgaben mit Geduld und Übersicht den Weg bereitet hat und mir als hilfsbereiter Ansprechpartner jederzeit zur Seite stand. Sein wissenschaftlicher Eifer und seine Vision waren mir Inspiration und Vorbild.

Meinen Mitstreitern in der „fat rat group“ bin ich zu großem Dank verpflichtet: Dr. med. Lukas Burget, der an der Etablierung des Tiermodells maßgeblich mitgewirkt hatte, Dr. Samantha Jane Caton, die mir nicht nur während ihrer Zeit in München mit Rat und Tat freundschaftlich zur Seite stand, sowie Dr. Yinglong „Longlong“ Bai und Dr. med. vet. Max Bielohuby, der mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unermüdlich unterstützt hat. Die gemeinsame Zeit mit ihnen in Labor, Tierstall und Büro behalte in bester Erinnerung.

Dem ehemaligen Leiter der NEON Research Group an der Universität von Cincinnati und am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Prof. Matthias H. Tschöp (mittlerweile Direktor des Instituts für Diabetes und Adipositas am Helmholtz Zentrum München und Inhaber des Lehrstuhls für Stoffwechselerkrankungen an der Technischen Universität München) möchte ich stellvertretend für sein Team für die tolle Kooperation danken.

Ich danke Herrn Dr. med. Klaus-Jürgen Schotten vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der LMU für seine Unterstützung bei der statistischen Analyse meiner Daten.

Besonders herzlich möchte ich mich beim Team des endokrinologischen Forschungslabors, insbesondere bei Rita Schwaiger, Juliane Ramisch und Sarina Meurer, bedanken, die mich nicht nur geduldig und kompetent in die Durchführung der Immunoassays eingewiesen haben, sondern auch sonst bei zahllosen Schwierigkeiten stets eine große Hilfe waren. Außerdem möchte ich Dr. Jenny Manolopoulou danken, die ich als fabelhafte Schreibtischnachbarin empfand.

Unermesslicher Dank, nicht nur für ihre Unterstützung während meines Studiums, gebührt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widmen möchte.

XII Lebenslauf

XIII Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
„Untersuchungen zum Einfluss nahezu kohlenhydratfreier, fettreicher Diäten auf die
somatotrope Achse bei der Ratte: Antagonisierung diätinduzierter Effekte durch Gabe von
rekombinantem Wachstumshormon“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand